



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DA VIDA ÚTIL DE DOIS PRODUTOS DE PASTELARIA ARMAZENADOS
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO

RAQUEL FILIPA FERREIRA MURO E SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Presidente

Doutor António Salvador Ferreira Henriques

Barreto

Vogais

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres

Ferreira

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Dr.^a Catarina Freire de Novais Santos Tiago

ORIENTADORA

Dr.^a Catarina Freire de Novais Santos Tiago

CO-ORIENTADORA

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres

Ferreira

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DA VIDA ÚTIL DE DOIS PRODUTOS DE PASTELARIA ARMAZENADOS
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO

RAQUEL FILIPA FERREIRA MURO E SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Presidente

Doutor António Salvador Ferreira Henriques
Barreto

Vogais

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres

Ferreira

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Dr.^a Catarina Freire de Novais Santos Tiago

ORIENTADORA

Dr.^a Catarina Freire de Novais Santos Tiago

CO-ORIENTADORA

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

2012

LISBOA

DEDICATÓRIA

À Avó Mimi e ao Avô Romeu

AGRADECIMENTOS

Alcançada mais uma vitória na minha vida, não posso deixar de agradecer às pessoas que foram fundamentais para que este sonho se tornasse real.

À Dr.^a Catarina Tiago por aceitar orientar o meu estágio assim como a minha dissertação. Pela enorme paciência em aturar o meu estado crónico de ansiedade, pelo carinho, amizade, confiança e ensinamentos transmitidos estarei eternamente grata. Toda a disponibilidade, eficácia e empenho que teve na correcção deste trabalho permitiu que o meu sonho se tornasse realidade. Um sincero muito Obrigada!

À Professora Doutora Marília Ferreira, minha Co-Orientadora, por me ter dado a mão e me ter proposto um estágio onde pude crescer quer a nível profissional como pessoal. Pela disponibilidade que sempre demonstrou perante qualquer questão na realização desta dissertação e acima de tudo por ser uma pessoa genuinamente bondosa que me tratou com um grande carinho e amizade enquanto aluna e estagiária.

Aos meus amigos (vocês sabem quem são) por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos durante este curso maravilhoso. A ti, Teresa, por termos partilhado juntas, todas as penosas épocas de exames, onde o nosso espírito de sacrifício e amizade prevaleceram e por isso Vencemos!

Ao Joel, à Lelé, à Sónia e à Teresa, agradeço as maratonas de biblioteca que fazíamos juntos para entregar os trabalhos um mês antes da data prevista!

Ao Luís por toda a disponibilidade e amizade demonstradas.

À minha irmã por ser a minha melhor amiga há 24 anos.

Por fim agradeço do fundo do meu coração aos meus pais, que me proporcionaram a realização deste curso. Desde cedo, sempre souberam que este era o meu sonho e em momento algum deixaram de me dar o seu apoio incondicional. À minha mãe agradeço por me mostrar o lado emocional da vida e ao meu Pai por me fazer ver tudo de uma maneira muito mais racional. Sem vocês nada disto seria possível!

RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade a determinação de vida útil de dois tipos de bolos produzidos por uma empresa que comercializa bolos do género *cake-design*. Ambos apresentavam massa de chocolate, diferindo no recheio: mascarpone e frutos silvestres num caso e recheio de doce de ovo noutro. Os diferentes bolos foram mantidos à temperatura ambiente e em refrigeração e foi também comparado o bolo mantido fechado ou após abertura. Aos bolos em estudo foram realizadas ao longo do tempo análises microbiológicas e provas sensoriais, paralelamente, nos momentos previamente determinados.

Obtidos os resultados das análises microbiológicas, estes foram comparados e classificados de acordo com os valores legais e com os valores guia, propostos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração.

Verificou-se que, para ambos os recheios, o armazenamento em refrigeração demonstrou ser o mais adequado do ponto de vista microbiológico, mas, sensorialmente estes bolos foram desvalorizados devido à alteração de textura da pasta de açúcar que os reveste e enfeita.

Também se pôde concluir que ambos os bolos, se abertos no próprio dia de confecção e armazenados à temperatura ambiente deverão ser consumidos no mesmo dia da sua abertura. Por sua vez, se confeccionados e mantidos fechados, deverão também ser consumidos no próprio dia do seu fabrico.

Palavras-Chave: *cake-design*; produtos de pastelaria; vida útil; qualidade e segurança alimentar; microbiologia alimentar.

ABSTRACT

The aim of this research work is to determine the shelf life of two type's cakes manufactured by a company that sells designer cakes. Both were made with chocolate dough and had different fillings: one of the cakes had a mascarpone and wild berries filling, while the other had an egg custard filling. The two different cakes were kept at room temperature and refrigerated and also under comparison was the fact that one was kept sealed in its package, while the other one was kept out of its package. Both test subjects underwent microbiological analysis and sensory testing within a specified time frame.

The microbiological results obtained were compared and classified according to the legal reference standards as defined by the Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) with the purpose of evaluating the microbiological of ready-to-eat foodstuffs prepared in restaurants and similar establishments.

It was noted that, for both fillings, refrigerated storage was the most adequate from a microbiological point of view, but, when subject to sensory tests, both cakes were rejected by would-be consumers due to the changes in the texture of the sugar paste icing and decorations.

It was also concluded for both cakes, if opened on the same day of confection and stored at ambient temperature, should be consumed at the same day of cut. Meanwhile, if confectioned and kept sealed, should also be consumed on the day of its confection.

Keywords: cake-design; bakery-products; shelf life; food safety and quality; food microbiology.

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA.....	I
AGRADECIMENTOS.....	III
ÍNDICE GERAL.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1. BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)	5
3.2. Produtos de Pastelaria	7
3.3. Especificidades do processo de fabrico de Produtos de Pastelaria	7
3.4. Deterioração dos Produtos de Pastelaria	9
3.4.1. Deterioração microbiológica.....	10
3.4.1.1. Deterioração Bacteriana.....	10
3.4.1.2. Deterioração por Leveduras.....	11
3.4.1.3. Deterioração por Bolores	12
3.4.2. Deterioração Física	12
3.4.3. Deterioração Química	14
3.5. Microrganismos indicadores de qualidade higiénica dos alimentos	14
3.6. Microrganismos de maior importância em produtos de pastelaria	17
3.6.1. <i>Salmonella</i> spp.	17
3.6.1.1. Fontes de contaminação	17
3.6.1.2. Surtos associados	18
3.6.1.3. Medidas de controlo	19
3.6.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.6.2.1. Fontes de contaminação	20
3.6.2.2. Surtos associados	21
3.6.2.3. Medidas de controlo	22
3.6.3. <i>Bacillus</i> spp.	23
3.6.3.1. Fontes de contaminação	23
3.6.3.2. Surtos associados	25
3.6.3.3. Medidas de controlo	25
3.6.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	26
3.6.4.1. Fontes de contaminação	26
3.6.4.2. Surtos associados	28
3.6.4.3. Medidas de controlo	28
3.7. Os microrganismos e as temperaturas de refrigeração	29
3.8. Vida útil de um alimento	33
3.8.1. Conceito de vida útil de um alimento	33
3.8.2. Factores que influenciam a vida útil de um alimento	33
3.8.3. Determinação da vida útil de alimentos	35
3.8.4. Evolução da necessidade da determinação de vida útil	37
3.8.5. Vida útil e vida útil sensorial de um alimento	38

4. ESTUDO DESENVOLVIDO.....	41
4.1. Enquadramento e justificação do estudo	41
4.2. Material e Métodos.....	43
4.2.1. Caracterização do produto em estudo	43
4.2.3. Análises microbiológicas	48
4.2.3.1. Preparação da amostra.....	48
4.2.3.2. Preparação das diluições	48
4.2.3.3. Contagem de Microrganismos aeróbios totais a 30°C.....	48
4.2.3.4. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	49
4.2.3.5. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positivo.....	49
4.2.3.6. Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	49
4.2.3.7. Contagem de bolores e leveduras	50
4.2.4. Análise Sensorial.....	50
4.2.4.1. Constituição do painel de Análise Sensorial	51
4.2.4.2. Preparação e apresentação das amostras	51
4.2.5. Análise de dados.....	52
4.3. Resultados e Discussão.....	54
4.3.1. Análises Microbiológicas	54
4.3.2. Classificação de resultados segundo os Valores Guia propostos pelo INSA.....	58
4.3.3. Resultados da Análise Sensorial	62
5. CONCLUSÃO	75
6. BIBLIOGRAFIA	77
ANEXO I.....	97
1.Ficha de análise sensorial.....	97
ANEXO II.....	98
1. Resultados da primeira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.	98
2. Resultados da segunda repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.	99
3. Resultados da terceira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.	100
4. Resultados da primeira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.....	101
5. Resultados da segunda repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.....	102
6. Resultados da terceira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S.aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.....	103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Principais condições para o desenvolvimento de alguns microrganismos potencialmente patogênicos de maior relevância em produtos de pastelaria. (Adaptado de Batista & Venâncio, 2003)	8
Tabela 2 – Valores de aW de alguns produtos de pastelaria. (Adaptado de Smith <i>et al.</i> , 2004).	9
Tabela 3 – Grupos de microrganismos classificados de acordo com as suas temperaturas de crescimento. (Adaptado de Garbutt, 1997).	30
Tabela 4 – Temperaturas de refrigeração recomendadas para as diferentes categorias de produtos. (Adaptado de Batista & Antunes, 2005).	32
Tabela 5 – Delineamento experimental do trabalho desenvolvido ao longo de três de semanas de estudo.	47
Tabela 6 – Valores Guia para Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer do grupo 1 proposto pelo INSA (2005).	52
Tabela 7 – Valores Guia para a Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer do grupo 2 proposto pelo INSA (2005).	53
Tabela 8 – Média das contagens obtidas nas três repetições (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.	54
Tabela 9 – Média das contagens obtidas nas três repetições (ufc/g) de leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.	56
Na tabela 10 mostra-se a classificação do bolo A com recheio de mascarpone e frutos silvestres de acordo com a proposta do INSA (2005).	58
Tabela 11 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005) para o bolo B com recheio de mascarpone e frutos silvestres.	59
Tabela 12 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), no bolo C com recheio de mascarpone e frutos silvestres.	59
Tabela 13 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), nos diferentes tempos de estudo para o bolo A com recheio doce de ovo.	60
Tabela 14 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), para o bolo B com recheio de doce de ovo.	61
Tabela 15 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i> , microrganismos a 30°C, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), para o bolo C com recheio de doce de ovo.	61
Tabela 16 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo A com recheio de Mascarpone e frutos Silvestres.	62
Tabela 16 (continuação) – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo A com recheio de Mascarpone e frutos Silvestres.	63
Tabela 17 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo B com recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres.	65
Tabela 18 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo C com recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres.	67
Tabela 19 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo A com recheio de Doce de Ovo.	69
Tabela 20 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo B com recheio de Doce de Ovo.	71
Tabela 21 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo C com recheio de Doce de Ovo	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Factores que influenciam a vida útil de um produto. (Adaptado de: Galic <i>et al.</i> , 2009). .	34
Figura 2 – Bolo com recheio de doce de ovo (à esquerda) e bolo de mascarpone e frutos silvestres (à direita).	43
Figura 3 – Fluxograma de Fabrico do bolo com recheio de mascarpone e frutos silvestres.	44
Figura 4 – Fluxograma de Fabrico do bolo com recheio de doce de ovos.	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição do número total de alimentos implicados em surtos humanos, verificados na UE em 2009. (Adaptado de EFSA, 2011).	6
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - Micrograma

ALOA – Agar *Listeria* segundo Ottaviani & Agosti

a_w - Actividade da água

BHI - Brain Heart Infusion

CAC - *Codex Alimentarius Commission*

DTA - Doenças transmitidas por alimentos

EFSA - *European Food Safety Authority*

EUA - Estados Unidos da América

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FMV - Faculdade de Medicina Veterinária

FSAI - *Food Safety Authority of Ireland*

FSIS - Food Safety Inspection Service

HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point*

ICMSF - *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ISO – *International Standard Organization*

TGE - *Tryptona Glucose Extract Agar*

TSA - *Tryptic Soy Agar*

TS - Triptona Sal

EU - União Europeia

ufc/g - Unidade Formadora de Colónias por grama

NZFSA - *New Zeland Food Safety Authority*

VRBD – *Violet Red Bile Dextrose Agar*

1. BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

Durante todo o meu percurso académico fui confrontada com várias vertentes do curso de Medicina Veterinária e foi no terceiro ano que a área de Segurança alimentar suscitou o meu interesse. Decidi então aprofundar os meus conhecimentos estagiando nesta área, onde tive oportunidade de desenvolver novas competências e adquirir não só experiência profissional, como também, pessoal.

Desta forma foi na empresa Plano Consultores, que me foram fornecidos os meios necessários para aprender, consolidar e aplicar correctamente conhecimentos adquiridos ao longo do curso, permitindo o desenvolvimento do meu sentido crítico relativamente aos assuntos de higiene e segurança dos alimentos.

Durante quatro meses de estágio tive a oportunidade de acompanhar as auditorias realizadas por técnicos da empresa aos diferentes estabelecimentos assessorados e que incluem, restaurantes, bares, cafés, pastelarias, cantinas e talhos.

Deste modo pude participar na implementação do sistema de segurança alimentar nestes estabelecimentos, nomeadamente através da:

- Elaboração e actualização da documentação associada ao sistema de segurança alimentar:
 - Elaboração de relatórios de auditoria com a indicação da respectiva não conformidade/ oportunidade de melhoria, medida correctiva apontada e ainda diploma legal associado no caso de existir;
 - Elaboração de fluxogramas de fabrico – após observação dos processos de fabrico *in situ*;
 - Revisão de procedimentos operativos e modelos de registo de Pontos de Controlo (PC) e dos Pontos Críticos de Controlo (PCC);
 - Acompanhamento de diversas formações sobre diferentes temas de higiene e segurança alimentar.
- Controlo e monitorização de Pré-requisitos e PCC/PC:
 - Revisão dos planos e registos de higienização – incluindo reuniões com fornecedores de produtos de higiene e criação de novos planos e registos;
 - Inspecção da zona de produção e câmaras de refrigeração/congelação;
 - Verificação dos prazos de vida útil dos produtos em loja;
 - Utilização e interpretação de testes rápidos aos óleos de fritura;
 - Interpretação de resultados de controlo analítico realizado a equipamentos e manipuladores (essencialmente às mãos);
 - Elaboração e revisão das *check-list* das auditorias de monitorização do sistema de segurança alimentar;
 - Identificação e correcção de não-conformidades.

- Verificação do Sistema HACCP:
 - Verificação das folhas de registo dos PCC e PC, destacando-se a observação detalhada dos registos de temperatura das câmaras de refrigeração/congelação assim como o controlo das temperaturas de confeção e manutenção de alimentos quentes; Interpretação de resultados de análises microbiológicas realizadas a produtos alimentares;
 - Acompanhamento de diversas acções de formação realizadas pela minha Orientadora.
 - Acompanhamento de auditorias internas e externas a diferentes estabelecimentos pela empresa Plano Consultores.

Finalizando o meu estágio, durante cerca de um mês, realizei, no Laboratório de Tecnologia Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa análises microbiológicas assim como provas sensoriais a dois produtos de pastelaria mantidos sob diferentes condições de conservação, com o objectivo de estudar o seu tempo de vida útil, cuja determinação, foi o tema escolhido para esta dissertação.

A realização deste estágio foi, sem dúvida, uma mais-valia para a minha formação, na medida em que me permitiu perceber o quão fundamental é o papel do Médico Veterinário na garantia da segurança e qualidade dos alimentos destinados ao consumo humano.

2. INTRODUÇÃO

Apesar das poucas evidências, sabe-se hoje que a escolha de alimentos por parte do consumidor está dependente de factores ambientais, orgânicos e cognitivos. O ser humano acaba por ser condicionado, de algum modo, a ingerir determinados alimentos em função da situação específica em que se encontra. Por exemplo, o consumo de bolos em aniversários ou outras comemorações é uma característica cultural assim como o consumo de sopa muitas vezes aparece associado a dietas hipocalóricas (Hebeda & Zobel, 1996).

Os alimentos, para além do seu valor biológico, social e cultural, apresentam também um carácter lúdico e etnográfico. Com base nestas particularidades, o crescimento de empresas fabricantes de bolos “*Cake design*” têm vindo aumentar. As crianças são particularmente o público-alvo destas empresas, uma vez que a decoração, o formato e as dimensões destes bolos satisfazem os requisitos exigidos pelos mais novos. Deste modo, torna-se impreterível determinar o tempo de vida útil destes bolos de forma a garantir a segurança e a satisfação dos consumidores.

A validade de um produto está dependente da sua formulação, do tipo de acondicionamento, assim como da temperatura e humidade a que está sujeito, sendo que a sua predição aplicando uma boa margem de segurança é fundamental para garantir que o produto é adquirido com a segurança e qualidade desejável.

No que diz respeito aos produtos de pastelaria, a maior parte constituídos por produtos de origem animal, como é o caso dos ovos, leite, natas, manteiga entre outros, cabe ao Médico Veterinário o controlo de uma parte da cadeia de produção, devendo este dar especial atenção aos produtos prontos a comer e aos de elevada perecibilidade.

Compete então ao Médico-Veterinário, conhecedor de toda a extensa cadeia produtiva dos alimentos de origem animal, a capacidade interventiva em cada uma das etapas a fim de prevenir a contaminação de ingredientes/produtos utilizados amplamente em todo o sector alimentar.

Este trabalho tem como objectivo determinar o tempo de vida útil de dois tipos de bolos cobertos e decorados com pasta de açúcar, de recheios distintos, quando sujeitos a diferentes condições de conservação.

Para isso fizeram parte do estudo desenvolvido, 6 lotes de bolo de chocolate, 3 com recheio de mascarpone e frutos silvestres e 3 com doce de ovo, produzidos em dias diferentes, sendo que cada lote era constituído por 4 bolos.

Os dois tipos de bolo foram simultaneamente sujeitos a análises microbiológicas e provas sensoriais nos tempos pré-determinados de acordo com o plano experimental delineado, com o objectivo de determinar o tempo de vida útil de cada um.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

O crescimento do comércio internacional e as facilidades de deslocação actuais aumenta o número de pessoas que consome os alimentos e potencia a disseminação de agentes potencialmente patogénicos que eventualmente vinculem. Hoje em dia, o mundo está cada vez mais interligado e interdependente, pelo que um surto de doenças transmitidas por alimentos, local, com relativa facilidade se torna uma ameaça potencial para o mundo inteiro (Tauxe, Doyle, Kuchenmuller, Schlundt & Stein, 2010).

Os factores que contribuem para a ocorrência das DTA podem ser divididos em três grupos distintos: factores que influenciam a contaminação dos alimentos; factores que permitem a proliferação de microrganismos potencialmente patogénicos; e os factores que permitem a sobrevivência dos microrganismos patogénicos nos alimentos (CDC, 2006).

As DTA, especialmente as que têm na sua génese microrganismos patogénicos constituem um problema de saúde pública cujo impacto é elevado. Surgem sob diversas formas que se podem expressar por ligeiras indisposições até situações mais graves, que podem requerer cuidados hospitalares, podendo mesmo culminar de forma fatal (Soares, 2007).

As DTA são comuns a todos os países do mundo, incluindo os mais desenvolvidos e clinicamente podem traduzir-se em dois tipos de apresentação: doença infecciosa normalmente provocada por bactérias e intoxicação que pode ter origem química, bacteriana ou através da contaminação por toxinas de origem natural existentes nos alimentos (Soares 2007).

O factor de contaminação mais comumente relatado provem do contacto das mãos dos manipuladores com os alimentos (CDC, 2006). Uma efectiva lavagem das mãos pode evitar a transmissão das infecções entéricas (Greig & Lee, 2009).

Num estudo sobre surtos em escolas dos Estados Unidos da América (EUA), de 1973 a 1997, cerca de 57% daqueles foram atribuídos à contaminação durante a manipulação e preparação dos alimentos (Daniels *et al.*, 2002). Mead *et al.* (1999), estimaram que nos EUA, todos os anos, existem aproximadamente cerca de 76 milhões de DTA das quais 365 mil levam a hospitalização e 5 mil resultam na morte dos doentes. A cada ano milhares de consumidores norte-americanos sofrem de algum tipo de doença de origem alimentar com sintomas que variam de moderados a fatais (Smith *et al.*, 2004).

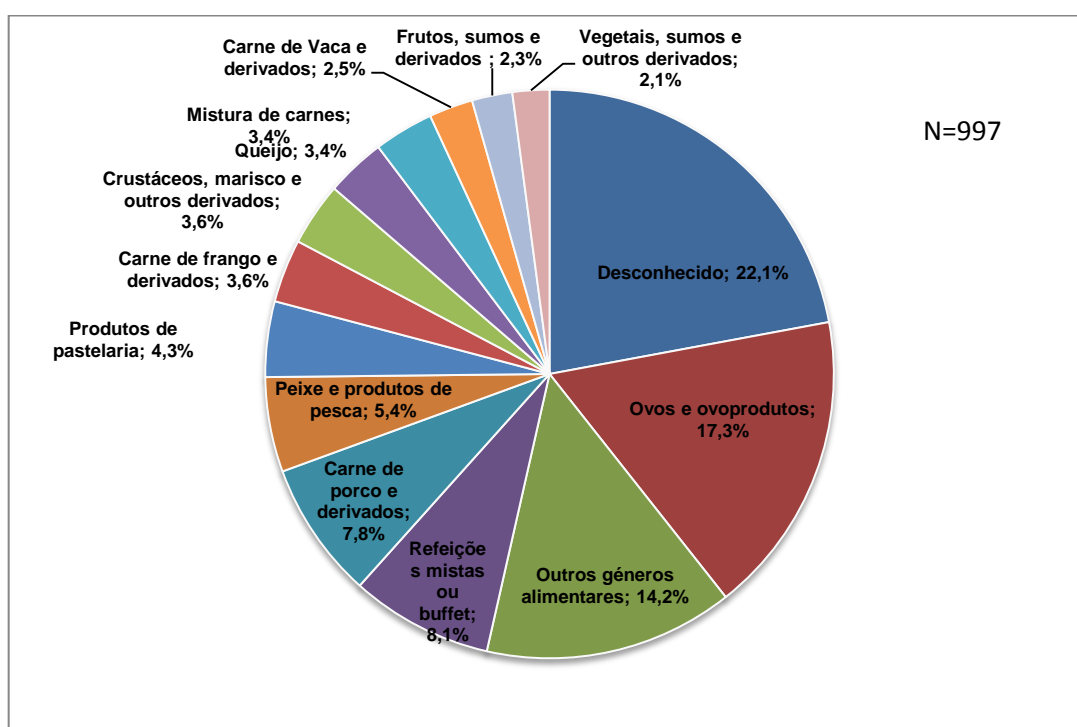
De acordo com um estudo realizado por Oliveira, Paula, Capalonga & Tondo (2010), microrganismos tais como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* foram os agentes bacterianos encontrados com maior frequência nas DTA ocorridas em diferentes países, enquanto que *Listeria monocytogenes* demonstrou ser a principal responsável pelos casos fatais relacionados com as DTA ocorridas nos EUA. Os

alimentos mais frequentemente relacionados foram os crus ou parcialmente cozidos, essencialmente os à base de ovos e produtos cárneos (Oliveira *et al.*, 2010).

De acordo com Todd (1996), 35 a 47% de todos os surtos de doenças de origem alimentar ocorridos na Polónia, Bulgária e Suíça tiveram como causa o consumo de produtos de pastelaria. Entre 1988 e 1990 no Brasil, vários novos surtos foram atribuídos ao queijo fresco e a bolos recheados com cremes, sendo o principal microrganismo envolvido *S. aureus* (Potter, Ayala & Silarug, 1997).

Um estudo realizado pela *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2009, referente a alimentos implicados em surtos de origem alimentar na União Europeia (EU) está representado no gráfico 1, onde é possível verificar que os ovos e os ovoprodutos foram responsáveis por 17,3% dos surtos ocorridos e 4,3% a produtos de pastelaria (EFSA, 2011).

Gráfico 1 – Distribuição do número total de alimentos implicados em surtos humanos, verificados na UE em 2009. (Adaptado de EFSA, 2011).



Embora alimentos como a carne, peixe, ovos e produtos lácteos sejam conhecidos por serem os veículos mais comuns para a transmissão de microrganismos patogénicos alimentares, os produtos de pastelaria também têm vindo a ser implicados no aparecimento de DTA (Tood, 1996). Existem assim várias razões para que estes produtos estejam associados a novas doenças de origem alimentar, entre as quais se destacam as condições de processamento e armazenamento assim como a utilização de produtos/ingredientes perigosos no fabrico dos mesmos (Smith *et al.*, 2004).

3.2. Produtos de Pastelaria

Os produtos de pastelaria podem ser classificados de acordo com os seus constituintes em três categorias distintas: os Não doces (salgados) onde se enquadram, por exemplo, produtos tais como o pão rústico, bases de *pizzas*, *croissants*; os Doces, tais como bolos de fruta, panquecas, bolachas e *donuts*; e os Produtos recheados, como é o caso dos bolos com creme, tartes de fruta, folhados de salsicha e *quiches*. No entanto, estes produtos podem também ser classificados relativamente à gama de valores de pH e a_w , sendo estes dois parâmetros fundamentais para o reconhecimento do potencial de deterioração e da segurança dos produtos de pastelaria (Smith *et al.*, 2004).

3.3. Especificidades do processo de fabrico de Produtos de Pastelaria

Com o intuito de atingir atributos desejáveis de textura e qualidade, a maioria dos produtos de pastelaria e panificação só recebe um tratamento de processamento pelo calor moderado. Por exemplo, o pão que é cozinhado a alta temperatura raramente excede os 100°C durante alguns minutos no centro da sua massa. Para além disso alguns produtos de pastelaria incluem cremes, doce de ovos sem processamento térmico, glacé, especiarias, frutos secos, coberturas e recheios de fruta, que podem ser preparados sem qualquer tipo de processamento térmico (Smith *et al.*, 2004).

Ainda que as formas vegetativas dos microrganismos presentes nos produtos sejam destruídas durante a fase de confecção, pode ocorrer, posteriormente, contaminação pós-confecção através do ar, dos equipamentos e das próprias mãos dos profissionais (Sugihara, 1977). Para além disso, a contaminação cruzada será uma realidade provável se os produtos de pastelaria forem armazenados ou preparados na mesma área onde são manipulados outros alimentos, tais como ovos, carne ou leite (Smith *et al.*, 2004).

No que diz respeito à utilização de produtos/ingredientes potencialmente perigosos, muitos produtos de pastelaria e os seus ingredientes apresentam um $\text{pH} > 4.6$ e um $a_w > 0.85$ reunindo assim as condições favoráveis ao crescimento de bactérias patogénicas (Smith *et al.*, 2004). Por exemplo o pH do glacé usado como cobertura e recheio de diversos bolos encontra-se entre os 5.8-6.6 reunindo assim as condições ideais para o crescimento de *Salmonella* spp. (Bryan, 1976).

Segundo Smith *et al.* (2004), embora o glacé dos bolos apresente um baixo valor de a_w , o contacto que se estabelece entre o bolo e o glacé promove a migração de humidade e consequente elevação do a_w favorecendo assim bastante o crescimento microbológico. Siilliker & McHugh (1967) reportaram um incidente deste género em que *S. aureus* cresceu na superfície de contacto entre o bolo e o glacé.

Contudo, também é importante evidenciar que tanto o valor de pH como o de a_w podem alterar-se durante o armazenamento do produto (Smith *et al.*, 2004).

Muitas vezes os produtos de pastelaria, com exceção dos recheados com natas e cremes diversos, ovos ou outros, são mantidos à temperatura ambiente, tentando talvez maximizar as condições de armazenamento dos estabelecimentos. Contudo, tais condições propiciam o crescimento microbiológico nos produtos comprometendo assim a sua segurança. Para além disso, muitos destes produtos são cozinhados e em seguida guardados, não voltando a ser sujeitos a altas temperaturas antes do seu consumo, não havendo por isso qualquer margem de segurança para destruir as bactérias que eventualmente tenham sobrevivido ao processo de confecção ou que tenham sido introduzidas durante o armazenamento e transporte (Smith *et al.*, 2004).

O bolo de frutas, um produto alimentar com elevado teor de humidade armazenado à temperatura ambiente, tem vindo a ser associado a vários casos de surtos de intoxicação alimentar envolvendo *Bacillus cereus* (Smith *et al.*, 2004).

Também os produtos recheados com natas, carne, queijo, peixe e marisco têm vindo a ser conotados como veículos de doenças de origem alimentar. Ainda que armazenados em refrigeração, estas temperaturas podem não ser suficientes para impedir o crescimento de eventuais bactérias patogénicas psicotróficas existentes nos recheios como é o caso de *L. monocytogenes*. Para além disso, existem constantemente alterações de temperatura na cadeia de processamento, distribuição, armazenamento assim como em casa do consumidor que favorecem o crescimento de microrganismos patogénicos nos alimentos (Smith *et al.*, 2004). De acordo com Schmidt & Ridley (1985), se os produtos forem congelados, o crescimento bacteriano será retardado, mas assim que se proceda à descongelação, o crescimento recomeçará.

Na tabela 1 estão representados os microrganismos de maior importância em produtos de pastelaria e os respectivos valores de temperatura e pH (mínimos e máximos) a_w (mínimo) e percentagem máxima de NaCl, necessários ao seu crescimento.

Tabela 1 – Principais condições para o desenvolvimento de alguns microrganismos potencialmente patogénicos de maior relevância em produtos de pastelaria. (Adaptado de Batista & Venâncio, 2003)

Microrganismos Patogénicos	Tmin (°C)	Tmax (°C)	pHmin	pHmax	a_w min	NaCl max (%)
<i>Salmonella</i> spp.	5	47	4,2	9,5	0,94	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	48	4	10	0,83	20
<i>Staphylococcus aureus</i> -toxina	10	46	4,5	9,6	0,88	10
<i>Bacillus cereus</i>	5	55	4,9	8,8	0,93	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	45	4,39	9,4	0,92	10

3.4. Deterioração dos Produtos de Pastelaria

A deterioração dos produtos de pastelaria é determinada por factores inter-relacionados, tais como a temperatura e humidade relativa a que o alimento está sujeito, teor de conservantes utilizados, pH do alimento, material de embalagem e atmosfera gasosa que envolve o produto e fundamentalmente pela actividade da água- a_w (Smith *et al.*, 2004).

Os produtos de pastelaria assim como a maioria dos alimentos processados, são sujeitos a deterioração física, química e microbiológica. Enquanto que a deterioração física e química limitam a validade de produtos com um grau de humidade baixa e intermédia, a deterioração microbiológica é importante nos produtos com humidade alta, ou seja, com uma elevada actividade de água ($a_w \geq 0,85$) (Smith *et al.*, 2004).

Assim, os produtos de pastelaria podem ser classificados de acordo com o seu pH em três grupos: produtos de pastelaria de acidez elevada com $\text{pH} \leq 4.6$, produtos de pastelaria de baixa acidez com $\text{pH} > 4.6$ e < 7 e produtos de pastelaria não ácidos com $\text{pH} \geq 7$ (Smith *et al.*, 2004).

Segundo Smith & Simpson (1995) estes produtos podem ser agrupados em três categorias de acordo com o seu a_w : os de baixa humidade ($a_w \leq 0,6$), os de humidade intermédia ($0,6 < a_w < 0,85$) e os de humidade elevada que geralmente apresentam o seu $a_w \geq 0.85$. Na tabela 2 estão representados alguns produtos de pastelaria com o seu respectivo a_w .

Tabela 2 – Valores de a_w de alguns produtos de pastelaria. (Adaptado de Smith *et al.*, 2004).

a _w de alguns produtos de pastelaria		
Teor de humidade	Produto	a _w
Baixo	Bolachas	0,2 – 0,3
	<i>Crackers</i>	0,2 – 0,3
Intermédia	Roscas revestidas com chocolate	0,82 – 0,83
	Bolos com creme	0,78 – 0,81
	Bolinhos fofos	0,5 – 0,78
Elevado	Pão	0,96 – 0,98
	Tartes de frutas	0,95 – 0,98
	<i>Cheesecake</i>	0,91 – 0,95
	Bolo de Cenoura	0,94 – 0,96
	Massa de <i>Pizza</i>	0,94 – 0,95

3.4.1. Deterioração microbiológica

Ooraikul (1991), estimou que somente nos EUA a perda devido a deterioração microbiológica atinge cerca de 1 a 3% dos produtos de pastelaria, ou seja, um valor superior a 90 milhões de quilos por ano, valor estimado apenas com base nas perdas dentro dos estabelecimentos porque se fossem contabilizadas as que ocorrem no consumidor a perda total atingiria proporções impressionantes.

Segundo Smith *et al.* (2004), o factor mais importante na deterioração microbiológica dos produtos de pastelaria é o a_w . O valor de a_w mínimo para o crescimento dos microrganismos deteriorantes é de 0,6. Em produtos de pastelaria com $a_w < 0,6$ este tipo de alteração não é um problema, no entanto nos que apresentam um teor de humidade intermédia (a_w de 0.6 a 0.85) as leveduras osmófilicas e os bolores são os microrganismos de deterioração predominantes, enquanto em produtos com elevada humidade, quase todas as bactérias, leveduras e bolores são capazes de crescer (Smith, 1992), limitando o seu período de vida útil.

Assim, os métodos para controlar este tipo de deterioração, têm uma importância económica significativa para a indústria pasteleira (Smith *et al.*, 2004).

3.4.1.1. Deterioração Bacteriana

Uma vez que a maior parte das bactérias necessita para se multiplicar de um a_w elevado, os problemas bacterianos nos produtos de pastelaria e panificação estão limitados aos que apresentam um conteúdo elevado em humidade. No caso dos bolos e do pão o problema bacteriano mais frequente é denominado como *ropeness* sendo provocado por *Bacillus subtilis*, uma bactéria produtora de esporos. Esta bactéria está usualmente presente nos ingredientes crus, como por exemplo, nas farinhas, açúcar e fermento, sendo capaz de sobreviver ao processamento de confeção. É capaz de germinar a temperaturas baixas e crescer tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose nas embalagens (Smith *et al.*, 2004).

De acordo com Smith (1992), o *ropeness*, no caso do pão, faz com que o mesmo apresente um sabor característico similar ao de melão maduro. O miolo torna-se descolorado e pegajoso, devido à degradação das proteínas e do amido durante o crescimento desta bactéria.

No entanto os problemas relacionados com este processo, ainda que com um impacto mínimo em termos de segurança alimentar, podem ser ultrapassados recorrendo ao uso de conservantes químicos como o propionato ou naturais como o ácido acético (Smith *et al.*, 2004).

De acordo com Seiler (1978), os bolos não recheados podem sofrer deterioração similar à do pão. Contudo, quando os bolos são recheados ficam sujeitos, adicionalmente, a outros tipos de degradação microbiológica. Muitos recheios podem suportar o crescimento de

microrganismos patogénicos, especialmente se contiverem ovos ou produtos lácteos. Produtos com recheio de creme de ovo são potencialmente perigosos para a saúde do consumidor devido à possibilidade de crescimento de *B. cereus* e *S. aureus* (Smith *et al.*, 2004).

Para além disto, doenças relacionadas com a presença de microrganismos patogénicos tais como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *B. cereus* estão intimamente ligadas a vários produtos de pastelaria. Por seu lado, o *Clostridium botulinum* é uma preocupação quando se trata de produtos com alto teor de humidade que foram embalados em atmosfera modificada. Assim os produtos com alto teor de humidade, recheados ou não, têm sido implicados em doenças de origem alimentar e por consequência levantam questões de segurança para o consumidor (Smith *et al.*, 2004).

3.4.1.2. Deterioração por Leveduras

A deterioração por leveduras ocorre principalmente em produtos de pastelaria com humidade intermédia e elevada (Smith *et al.*, 2004).

De acordo com Legan & Voysey (1991) os problemas causados por leveduras nestes produtos podem dever-se ao crescimento visível de leveduras à superfície dos alimentos, ou à deterioração fermentativa de um variado tipo de produtos ou ingredientes.

O primeiro tipo é caracterizado pelo aparecimento de áreas brancas ou rosadas, enquanto que o segundo é manifestado pela formação de compostos, como por exemplo, esteréis e álcoois que apresentam odores característicos e/ou sinais visíveis de produção de gases (Legan & Voysey, 1991).

Segundo Seiler (1978), o crescimento visível de leveduras à superfície ocorre em produtos com elevada a_w e reduzida vida útil, enquanto que para a deterioração fermentativa ocorrer os produtos têm de apresentar características totalmente opostas, tais como, baixa a_w e uma vida útil prolongada (bolos de fruta e pudins de chocolate).

A levedura osmotolerante mais comum que causa deterioração em coberturas altamente açucaradas e recheios constituídos por compotas, massapão e carne picada, é denominada *Zygosaccharomyces rouxii*. A contaminação por leveduras osmofílicas normalmente resulta de equipamentos e utensílios mal higienizados. Portanto, manter as boas práticas de fabrico irá minimizar a contaminação por este tipo de leveduras. No entanto a utilização de conservantes, tais como, sobartos, benzoatos e parabenos demonstraram ser eficazes no controlo deste tipo de deterioração (Smith *et al.*, 2004).

3.4.1.3. Deterioração por Bolores

O crescimento de bolores constitui igualmente uma limitação à vida útil de produtos de pastelaria de humidade intermédia e elevada. Muitos bolores são capazes de crescer em alimentos com $a_w > 0.8$, enquanto que alguns bolores xerofílicos crescem em valores tão baixos como 0.65. As perdas causadas por este tipo de deterioração variam entre 1 a 5% dependendo da estação do ano, do tipo de produto e do método de processamento utilizado (Malkki & Rauha, 1978).

A deterioração por bolores pode constituir uma séria preocupação económica para a indústria pasteleira. Os produtos de pastelaria frescos, ainda que possam estar livres de bolores na forma vegetativa ou esporolada, podem rapidamente sofrer contaminação pós-confecção através de esporos provenientes do ar, superfícies e equipamentos de confecção, através das mãos dos profissionais e de ingredientes crus contaminados, tais como, açúcares ou frutos secos, entre outros (Jarvis, 1972; Seiler, 1978, 1988).

De acordo com Seiler (1978), os bolores contaminantes mais frequentemente detectados em bolos, no Reino Unido, foram *Wallemia sebi*, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* e bolores do grupo *Glaucus*, sendo que o número de esporos encontrados era mais elevado nos meses quentes do ano.

De acordo com Smith *et al.* (2004), a forma mais eficaz de prevenir a contaminação pós confecção dos produtos com bolores consiste em arrefecer, cortar e embalar os alimentos num ambiente controlado microbiologicamente. No entanto a eficácia de qualquer método de controlo da deterioração por bolores é influenciado pelo tipo e níveis de esporos presentes num determinado produto, assim como pelas características do próprio produto (Smith *et al.*, 2004).

3.4.2. Deterioração Física

A perda ou ganho de humidade é um problema sério em muitos produtos de pastelaria que pode resultar em mudanças de textura, chegando mesmo a promover a deterioração química e microbiológica em produtos com teores de humidade baixa a intermédia. O problema de deterioração física mais grave em produtos de pastelaria é o endurecimento (*Staling*). O endurecimento tem sido definido como uma alteração com baixo grau de deterioração microbiológica, que ocorre no pão assim como noutros produtos de pastelaria durante ou após o período de confecção, tornando-os menos aceitáveis pelo consumidor (Hebeda & Zobel, 1996).

De acordo com Sych, Castaigne & Lacroix (1987) e Gómez, Oliete, Pando, Ronda & Caballero (2008), o grau de endurecimento é um dos atributos mais importantes na qualidade dos bolos sendo caracterizado por um processo complexo que inclui a perda de sabor, mudanças na textura, perda de maciez e redistribuição da humidade, contribuindo todas estas mudanças para a diminuição da aceitação do produto.

Segundo Quail (1996), as maiores alterações que ocorrem após a confecção são a redistribuição da humidade, o endurecimento do produto e perda do seu aroma e sabor.

Os produtos com alto teor de humidade, como é o caso do pão e de alguns bolos, endurecem mais depressa do que os com baixa e intermédia, tais como biscoitos e bolachas de água e sal (Smith *et al.*, 2004).

O endurecimento tem um grande impacto económico para a indústria da pastelaria e panificação. A nível mundial, num mercado onde cerca de 20 milhares de milhões de quilos de pão são produzidos anualmente, existe um retorno estimado de 3% (mais de 600 milhões de quilos) de pão devido ao endurecimento, o que representa uma preocupação económica tanto para a indústria panificadora como para os consumidores (Hebeda & Zobel, 1996).

Os biscoitos e as bolachas apresentam um conteúdo lipídico mais elevado do que o pão tendo tendência a envelhecer e a endurecer mais lentamente. Contudo, estes produtos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de oxidação lipídica e aparecimento de sabor rançoso (Smith *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos sobre o endurecimento dos bolos é baseada em análises de textura após o armazenamento ou então na avaliação das diferenças de textura entre o primeiro e o último dia de um determinado período de tempo (Gómez, Ruiz-París, Oliete & Pando, 2010). Outro exemplo de deterioração física a que os produtos de pastelaria estão sujeitos inclui a migração de humidade entre os diferentes componentes do alimento. Este processo altera as propriedades organolépticas dos produtos, comprometendo a sua qualidade. A perda da textura crocante das bolachas e da maciez dos bolos, são exemplos desta alteração física. Um método para prevenção da migração de humidade dos alimentos envolve cobrir uma ou mais superfícies do produto alimentar com uma barreira comestível de humidade. Tais barreiras devem ter uma baixa permeabilidade à humidade de maneira a que previnam a migração da água entre as áreas de atividade aquosa diferentes. Para além disso a barreira deve cobrir a superfície do alimento por completo, devendo ser suficientemente forte e flexível para constituir uma superfície contínua que não irá quebrar aquando da sua manipulação. (Frampton, 1989). No entanto deve ser facilmente perfurada durante o consumo do alimento que protege. Para além disso as propriedades organolépticas de sabor e textura devem ser impercetíveis para que o consumidor não se aperceba da existência da barreira aquando do consumo do produto (Frampton, 1989).

Relativamente aos produtos armazenados em refrigeração, também estes estão sujeitos a alterações e deterioração física. Se o ar circulante dentro da câmara apresentar uma humidade relativa superior a 85%, alguma desta humidade irá condensar no alimento fazendo com que este amoleça, favorecendo o desenvolvimento de bolores e bactérias nos produtos (Zinzi, 2009).

3.4.3. Deterioração Química

Os produtos de pastelaria, especialmente aqueles com alto conteúdo em gordura, estão sujeitos a deterioração química nomeadamente a rancificação. Esta é caracterizada pela degradação lipídica que resulta na alteração de odores e sabores tornando os produtos sensorialmente alterados e reduzindo o seu tempo de vida útil (Smith *et al.*, 2004).

Dois tipos principais de rancificação podem ocorrer: oxidativa e hidrolítica. A rancificação oxidativa resulta na degradação de ácidos gordos insaturados pelo oxigénio, por meio de um mecanismo autolítico de radicais livres. Consequentemente há formação de aldeídos responsáveis pela produção de maus cheiros, cetonas e ácidos gordos de cadeia curta. Estes três radicais e os peróxidos formados durante a oxidação lipídica podem agravar ainda mais os efeitos deteriorantes na qualidade dos alimentos por branqueamento de pigmentos, destruindo certas vitaminas como a A e E e promovendo a degradação proteica (Smith *et al.*, 2004).

A rancificação hidrolítica é originada pela presença de certas enzimas como as lípases e lipoxigenases assim como pela humidade. Este tipo de rancificação advém da ausência de oxigénio, como resultado da hidrólise dos triglicéridos e subsequente libertação do glicerol e de ácidos gordos responsáveis pela libertação de maus odores (Smith *et al.*, 2004).

Existe outro tipo de deterioração química a que os produtos de pastelaria estão sujeitos, que consiste na absorção de cheiros fortes. Neste tipo de deterioração os óleos e as gorduras constituintes dos alimentos que são armazenados próximos de outros alimentos com cheiros fortes como cebolas e alhos, ou de produtos como tintas, detergentes e desinfetantes, absorvem esses cheiros tornando os produtos desagradáveis ao paladar (Hintlian & Hotchkiss, 1986).

Podem ainda ocorrer outras reacções químicas: os produtos ricos em açúcar como os bolos, ou o pão, aquando do processamento térmico, estão sujeitos à reacção de Maillard, que consiste numa reacção química entre açúcares redutores e proteínas por acção do calor, que resulta na formação de compostos que, além de sabor e *flavour*, também conferem uma coloração acastanhada/dourada aos produtos alimentares. A reacção de Maillard, também é designada como “acastanhamento não enzimático” (Lawrie & Ledward, 2006).

Por sua vez, o acastanhamento enzimático ocorre principalmente nos bolos e tartes recheados de fruta ou legumes quando cortados e expostos ao ar. As enzimas presentes nestes alimentos conduzem à reacção oxidativa formando compostos acastanhados. No entanto, se estes produtos forem sujeitos a tratamento térmico as enzimas responsáveis por este processo são destruídas. As frutas mais utilizadas em recheios de produtos de pastelaria, como a maçã, pera, banana e pêssigo apresentam maior predisposição para o acastanhamento enzimático (Hintlian & Hotchkiss, 1986).

3.5. Microrganismos indicadores de qualidade higiénica dos alimentos

Os microrganismos indicadores de qualidade higiênica dos alimentos são rotineiramente utilizados para avaliar as condições de higiene e segurança do produto final, assim como da higiene empregue durante o seu processamento (Sant`ana, Silva, Farani & Amaral, 2003).

De acordo com Forsythe (2002), os microrganismos indicadores são aqueles cuja presença num alimento, pode fornecer dados sobre a contaminação fecal, sobre a potencial presença de microrganismos patogénicos e ainda sobre deterioração potencial do produto alimentar. Deste modo, os agentes microbiológicos utilizados como índices de qualidade higiênica num produto podem indicar uma possível presença simultânea de microrganismos patogénicos que se relacionam fisiologicamente entre si. Por exemplo, a detecção de *E. coli* é utilizada como indicador de uma possível presença de patogénicos de origem entérica nos alimentos e na água (Mossel & García, 1985).

Segundo Gamazo, Lopez-Goñi & Diaz (2005), todos os alimentos apresentam um determinado teor microbiano, com excepção dos submetidos a tratamentos esterilizantes, o qual deve ser mantido durante a manipulação, embalagem e armazenamento a tais níveis que não comprometam a qualidade microbiológica dos mesmos.

O número e o tipo de microrganismos presentes nos produtos, está dependente do nível de contaminação do ambiente envolvente, especialmente das condições higiénicas das superfícies, dos equipamentos e utensílios utilizados durante o trabalho assim como das mãos dos trabalhadores que manipulam os alimentos (Gamazo *et al.*, 2005).

De acordo com Hui, Pierson & Gorham (2001) e Jay, Loessner & Golden (2005), os indicadores microbiológicos reflectem a qualidade microbiológica dos alimentos e uma vez presentes a determinados níveis específicos, conseguem indicar o estado de segurança do produto assim como o influenciar o seu tempo de vida útil.

Assim, os microrganismos indicadores associados à qualidade higiênica dos alimentos, incluem entre outros, a contagem de coliformes totais, *E. coli*, organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e *S. aureus* (Lues & Van Tonder, 2007).

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C é o melhor método para avaliar a qualidade microbiológica geral de alguns alimentos, tendo por isso uma relevância importante em microbiologia alimentar. No entanto a informação obtida através da contagem destes microrganismos, embora seja útil, não garante a segurança sanitária dos produtos, o que torna indispensável a pesquisa de organismos potencialmente patogénicos (Garbutt, 1997).

A contagem de coliformes totais tradicionalmente utilizada como indicador de higiene dos alimentos após o processamento veio a ser substituída pela contagem de *Enterobacteriaceae*. As *Enterobacteriaceae* incluem organismos importantes como a *Salmonella* spp. e a *E. coli* taxonomicamente bem definidas e os métodos utilizados para a sua enumeração têm como base propriedades comuns (Gilbert *et al.*, 2000; Crowley *et al.*, 2005).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são inactivadas facilmente através do uso de desinfectantes comuns sendo capazes de colonizar uma ampla variedade de nichos quando as condições de higienização são deficientes. Por este motivo a presença destas bactérias permite avaliar falhas no cumprimento escrupuloso de boas práticas de higienização dos espaços e equipamentos (Schaffner & Schaffner, 2004).

Anderson & Pascual (2000), afirmam que contagens elevadas de *Enterobacteriaceae* nos alimentos podem indicar uma confecção pouco higiénica dos mesmos, uma contaminação pós-confecção ou ambas as situações.

Tendo em conta que *E. coli* é um microrganismo que sobrevive durante pouco tempo fora do meio entérico, a sua presença nos alimentos indica contaminação fecal recente. Esta bactéria é considerada o melhor indicador deste tipo de contaminação devido à sua especificidade sendo que a sua quantificação directa é muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, tendo em conta a sua alta incidência no grupo fecal (Anderson & Pascual, 2000; Marchi, 2006). *E. coli* é isolada frequentemente em alimentos e produtos lácteos incluindo os armazenados a temperaturas de refrigeração (MacDonald *et al.*, 1985; Sperandio, 1998; Campos *et al.*, 2006).

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de Novembro sobre critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, no seu anexo I, definiu como critério de segurança a pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e de enterotoxinas estafilocócicas, estas últimas em produtos lácteos especialmente nos queijos.

De acordo com Lacasse (1995), *Staphylococcus* spp., é considerado um indicador de higiene em alimentos que são muito manipulados, sendo que uma contagem elevada deste microrganismo potencialmente patogénico poderá indicar que os produtos foram mantidos durante longos períodos de tempo à temperatura ambiente. No entanto uma deficiência na higiene pessoal ou dos alimentos também poderá levar ao aumento da sua contagem.

Quanto à *L. monocytogenes*, a sua presença pode dever-se a erros no manuseamento dos alimentos pelos trabalhadores, ou a inadequada higienização das instalações que assim podem contaminar os produtos com estirpes resistentes, durante um grande período de tempo (Todd & Notermans, 2011).

As práticas de higiene insuficientes durante a manipulação de alimentos, a utilização de matérias-primas contaminadas, um controlo inadequado das temperaturas ou a existência de uma contaminação cruzada são, entre outros, alguns dos factores que favorecem a presença de *Salmonella* spp. nos alimentos (Lacasse, 1995).

3.6. Microrganismos de maior importância em produtos de pastelaria

3.6.1. *Salmonella* spp.

3.6.1.1. Fontes de contaminação

A Salmonelose é uma doença gastrointestinal comum de origem alimentar a qual, embora na maioria dos casos seja auto-limitante, pode resultar em complicações crónicas nos indivíduos jovens, em idosos e em pessoas cuja imunidade está comprometida (D'Aoust, 1994).

A *Salmonella* spp. é normalmente isolada a partir dos animais assim como dos seus produtos e de ambientes de processamento (Ebel, David & Mason, 1992; Swanenburg, Urlings, Keuzenkamp & Snijders, 2001; Wells, Fedorka-Cray, Dargatz, Ferris & Green, 2001). Também pode surgir nos produtos de pastelaria através de uma larga gama de ingredientes, além de poder ser facilmente disseminada por contaminação cruzada quando os ingredientes ou os produtos acabados entram em contacto com outros alimentos ou superfícies contaminadas durante o processo de produção (Smith *et al.*, 2004).

Embora os ovos sejam considerados um dos veículos mais comuns para a transmissão da *Salmonella* spp. nos produtos de pastelaria, existem outros ingredientes que podem levantar preocupações a nível da segurança alimentar. A pasteurização do leite destrói esta bactéria em produtos lácteos como leite de consumo e em pó, manteiga, cremes de barrar e queijos, contudo se a pasteurização for inadequada ou os produtos sofrerem uma contaminação pós pasteurização o agente pode persistir (Ahmed *et al.*, 2000; Altekruze, Timbo, Mowbray, Bean & Potter, 1998; El-Gazzar & Marth, 1992; Johnson, Nelson & Johnson, 1990).

A pasteurização dos ovos mantém as suas propriedades funcionais como alimento e destrói efectivamente *S. enteritidis*, pelo que o uso de ovos não pasteurizados em pequenas pastelarias e em casa aumenta o risco da contaminação dos produtos por *Salmonella* spp. (Food Safety and Inspection Service, 1998). Além do mais, o manuseamento de ovos contaminados resulta frequentemente numa grande contaminação das superfícies de trabalho, dos equipamentos e das mãos (Humphrey, Martin & Whitehead, 1994; Humphrey, Whitehead, Gawler, Hanely & Rowe 1991).

Também na farinha já foi encontrada *Salmonella* spp. (Smith *et al.*, 2004). Richter, Dorneanu, Eskridge & Rao (1993), relataram que no seu estudo 1,3% de 4.000 amostras de farinha de trigo continham o agente. Embora a farinha seja um alimento “demasiado seco” para permitir o crescimento da bactéria, esta pode manter-se viável durante vários meses (Dack, 1961).

De acordo com D'Aoust (1997) e Torres-Vitela, Escartin & Castillo (1995) outros ingredientes de pastelaria tais como o cacau e o chocolate, em particular o de leite e a fruta (Golden,

Rhodehamel & Kautterl, 1993; Public Health Laboratory Services, 1993) já foram implicados em doenças de origem alimentar.

A *Salmonella* spp. é resistente à dissecação e pode sobreviver durante longos períodos de tempo em superfícies de trabalho e em alimentos com valor baixo de a_w , em particular os que têm um alto conteúdo em gordura. Uma vez reidratada consegue crescer rapidamente, especialmente se os produtos estiverem armazenados à temperatura ambiente (Smith *et al.*, 2004).

Visto que esta bactéria pode estar presente em muitos ingredientes crus de pastelaria, é necessário atenção especial para prevenir o seu crescimento a fim de minimizar a contaminação cruzada de outros ingredientes assim como de produtos finais (Smith *et al.*, 2004).

3.6.1.2. Surtos associados

Os sintomas de Salmonelose em pessoas que se encontrem em perfeito estado hígido podem ser ligeiros e por isso mesmo estima-se que muitos casos desta doença não sejam reportados (Tood, 1989). A maior parte dos surtos está associada à ingestão de produtos de pastelaria contaminados com *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, confirmando-se na maioria, que os ovos foram o principal veículo de transmissão (Smith *et al.*, 2004).

Muitos produtos de pastelaria que contêm ovos são sujeitos apenas a um ligeiro tratamento pelo calor para que mantenham as suas características “frescas e fofas”. Nestes produtos incluem-se recheios de sobremesas doces e salgadas, tartes, mousses, suspiros e *cheesecake*.

Esta leve exposição ao calor pode ser insuficiente para destruir por completo todas as *Salmonellas* spp. eventualmente existentes, dependendo do seu nível de incidência nos ingredientes crus e do binómio tempo-temperatura a que os alimentos são sujeitos durante o processamento (Hao, Scouten & Brackett, 1999). São comuns surtos neste tipo de doces, especialmente quando são preparados com ovos em casca não pasteurizados.

A prática de cozinhar e deixar arrefecer os alimentos à temperatura ambiente antes do seu consumo ou refrigeração facilita o crescimento dos microrganismos sobreviventes (Smith *et al.*, 2004).

Nos EUA, foi reportado um grande surto de Salmonelose, no qual uma pessoa morreu, devido ao consumo de tartes de doce de ovo preparadas industrialmente e armazenadas durante 21 horas à temperatura ambiente (CDC, 1990). Também Evans, Tromans, Dexter, Ribeiro & Gardner (1990) relataram surtos consecutivos de Salmonelose cuja origem proveio de uma única pastelaria. O primeiro surto foi atribuído à contaminação cruzada durante a preparação de uma mistura doce de ovo, a frio, numa tigela onde havia sido colocado anteriormente cascas de ovos. A limpeza e a desinfecção inadequada dos bicos

dos instrumentos de pasteleiro foi a fonte da contaminação cruzada que esteve na origem do segundo surto.

Quatro outros surtos foram causados pela contaminação cruzada derivada da utilização de ovos crus na produção de *petit gateaux* e de *cheesecake* (Wright *et al.*, 1996).

Embora um pH baixo possa ser utilizado para controlar o crescimento de bactérias patogénicas, não há qualquer garantia que produtos mais ácidos como tartes de fruta não estejam implicados em doenças de origem alimentar, pois tartes de maçã já estiveram envolvidas em surtos de Salmonelose. Muito provavelmente a contaminação cruzada poderá ter ocorrido através da mistura de leite com ovos em casca que normalmente é utilizada para pincelar a massa folhada destas tartes ou então durante o processo de embalamento das mesmas (Smith *et al.*, 2004).

3.6.1.3. Medidas de controlo

Tendo em conta que os ovos crus são uma fonte comum de *Salmonella* spp., o uso de ovos inteiros, claras de ovo e gemas pasteurizadas é essencial para o controlo da Salmonelose em produtos de pastelaria. Devem ser sempre utilizados ovos pasteurizados na confecção de produtos não cozinhados ou ligeiramente cozinhados. Se for necessário usar ovos crus devem evitar-se os ovos rachados de forma a reduzir o risco de contaminação (Tood, 1996). No entanto para garantir a segurança alimentar talvez seja prudente partir do princípio que todos os ovos são ingredientes potencialmente perigosos e que devem ser armazenados em instalações devidamente refrigeradas de forma a evitar o crescimento de *Salmonella* spp. (Smith *et al.*, 2004).

De acordo com Smith *et al.* (2004), as condições de processamento desempenham um papel fundamental na destruição deste microrganismo patogénico. O processo de cozedura normalmente destrói qualquer *Salmonella* spp. presente, mas o grau de inactivação irá depender de um número de factores relacionados entre si como a composição do produto (pH, a_w e presença de conservantes), o seu nível de contaminação inicial e do binómio tempo-temperatura utilizado durante o processamento térmico.

No que diz respeito ao creme de ovo, é necessária uma temperatura de 60°C durante 19 minutos para destruir 10^7 ufc/grama de *Salmonella* spp. No entanto se a temperatura for aumentada para os 65,7°C os mesmos resultados são conseguidos em apenas 3,5 minutos (Angelotti, Foster & Lewis, 1961).

A segurança alimentar está dependente de um grande número de variáveis sendo importante que todos os produtos de pastelaria e os seus ingredientes sejam arrefecidos rapidamente até atingirem 2-5°C de temperatura até 30 minutos após a sua preparação, independentemente do calor a que foram sujeitos. Assim o controlo rigoroso da temperatura é essencial para garantir a segurança dos ingredientes de pastelaria que contenham cremes frescos (Smith *et al.*, 2004).

Foi demonstrado por Bryan (1976), que a refrigeração de bolos com recheio de creme a 4°C prevenia o crescimento da *Salmonella* spp., sendo que mais tarde Schmidt & Ridley (1985) demonstraram, que embora o crescimento fosse mais lento, este patogénico se mantinha viável durante o armazenamento em refrigeração e congelação.

Desta forma, a má gestão da temperatura em qualquer um dos estádios de produção, distribuição e armazenamento podem comprometer a segurança dos produtos de pastelaria recheados com creme ou dos seus ingredientes. Nunca é demais enfatizar a importância de um apertado controlo de temperatura, pois este microrganismo pode crescer a temperaturas mínimas de 6°C. Embora seja possível utilizar protecções adicionais tais como o sorbato de potássio, para limitar o crescimento da *Salmonella* spp. nestes produtos (Wyatt & Guy, 1981a) não se deve encarar a utilização de conservantes como substituto para condições de armazenamento refrigeradas adequadas (Smith *et al.*, 2004). A aplicação de outras medidas tais como uma cuidadosa higiene pessoal, boas práticas de fabrico, formação constante do pessoal e implementação do HACCP são também essenciais para reduzir a contaminação cruzada por este microrganismo bem como para limitar a sua disseminação (Smith *et al.*, 2004).

3.6.2. *Staphylococcus aureus*

3.6.2.1. Fontes de contaminação

S. aureus é uma bactéria Gram positiva, anaeróbia facultativa, estimando-se que cerca de 50 a 70% das suas estirpes sejam enterotoxinogénicas. A sintomatologia característica de uma intoxicação provocada por esta bactéria traduz-se pelo aparecimento de náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, 2 a 6 horas após a ingestão de alimentos contendo a enterotoxina estafilocócica. A recuperação em âmbito hospitalar pode requerer até 3 dias de internamento, no entanto os casos fatais são raros (Tranter, 1990).

Sendo uma bactéria gram positiva é relativamente resistente à secagem e em condições baixas de a_w como as que prevalecem em frigoríficos domésticos, este patogénico resiste (Jackson, Blair, McDowell, Kennedy & Bolton, 2007).

Para surgir uma intoxicação alimentar parece bastar a ingestão de 0,1 ug de toxina por quilo (ICMSF, 1996a).

Embora *S. aureus* seja destruído pelo calor, as suas enterotoxinas são resistentes não sendo inactivadas pela pasteurização. A enterotoxina A está implicada em 75% de surtos enquanto que só ocasionalmente a enterotoxina B é a responsável (Bergdall, 1989).

Segundo Smith *et al.* (2004) as pessoas são a principal fonte de contaminação dos alimentos aquando do seu manuseamento e preparação ou, após a preparação, através do ar, superfícies contaminadas ou por contaminação cruzada. De facto, estando o *S. aureus* presente no corpo humano, nariz, garganta e pele, é talvez mais provável que contamine os

alimentos por contacto directo ou indirecto durante o seu manuseamento e armazenamento doméstico (Arbuthnott, 1990).

Os ingredientes também podem ser fontes de *S. aureus*, como é o exemplo do leite, soro de leite e natas onde já foram encontradas enterotoxinas desta bactéria (Bergdall, 1989). Segundo Giletto & Fyffe (1998), os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos de intoxicação por *S. aureus* são produtos de pastelaria e confeitaria com creme, carnes e produtos cárneos cozidos refrigerados, tais como o fiambre, peru e carne assada e produtos cárneos fermentados como o salame.

Um estudo feito por Anunciação, Linardi, do Carmo & Bergdoll (1995) demonstrou que o recheio de creme dos bolos é a fonte mais provável de enterotoxinas estafilocócicas que causam intoxicações alimentares. Ainda que o recheio possa sofrer um processamento térmico antes de ser introduzido no bolo, facilmente sofre contaminação durante a operação de confecção.

3.6.2.2. Surtos associados

Nos dias de hoje, a intoxicação por *Staphylococcus* é considerada uma doença comum encontrando-se entre as mais prevalentes causas de gastroenterite a nível mundial e resulta da ingestão de enterotoxinas formadas em alimentos contaminados (Anunciação *et al.*, 1995). É denominada como uma verdadeira intoxicação alimentar uma vez que não requer a multiplicação do microrganismo no hospedeiro mas apenas ingestão das suas toxinas para causar doença (Jablonski & Bohach, 1997).

Nos EUA os produtos de pastelaria recheados com natas frescas e sintéticas assim como com recheios de doce de ovos, eram anteriormente a principal causa de surtos de intoxicação alimentar envolvendo o *S. aureus*. Contudo, actualmente, estes produtos estão raramente implicados devido à implementação de boas práticas de fabrico assim como o recurso à refrigeração (Smith *et al.*, 2004).

No Brasil foi descrito um surto envolvendo 122 pessoas que ingeriram folhados com recheio de natas e um outro que foi atribuído ao consumo de éclairs de chocolate servidos no voo de Rio de Janeiro para Nova Iorque (Smith *et al.*, 2004).

Um estudo concluiu que 55% das tartes de natas armazenadas a temperatura ambiente em estabelecimentos comerciais no Brasil estavam contaminadas com a bactéria e 19,5% desses produtos continham uma contagem superior a 10^5 ufc/grama (Anunciação *et al.*, 1995).

McKinley & Clarke (1964), verificaram que embora as natas sintéticas não contivessem nutrientes suficientes para permitir o crescimento de *S. aureus*, a zona de contacto que se estabelece entre o bolo e as natas pode gerar condições favoráveis para tal.

Sumner, Albrecht & Peters (1993), isolaram *S. aureus* de 9,8% de 214 produtos de pastelaria, incluindo bolinhos de aveia e passas, queques de maçã, folhados de natas e travesseiros.

O a_w das bolachas é demasiado baixo para o crescimento da bactéria, no entanto em *muffins* de maçã, folhados de creme e em travesseiros a enterotoxina foi já isolada (Smith *et al.*, 2004).

De notar que os surtos de intoxicação alimentar por *S. aureus* podem ocorrer mesmo na ausência de células viáveis se as enterotoxinas pré-formadas estiverem presentes no produto, como resultado de um desvio do controlo da temperatura a que estes devem estar sujeitos. Potenciais problemas também podem ocorrer no caso dos recheios não cozinhados, como por exemplo, o *chantilly* e determinadas coberturas à base de ovos e natas.

Ainda que *S. aureus* seja um pobre competitivo, se a contaminação ocorrer após o processamento térmico, na qual a maioria das outras formas vegetativas já tenham sido destruídas, as condições favorecerão o seu rápido crescimento (Smith *et al.*, 2004).

A variedade crescente de produtos de pastelaria disponíveis à temperatura ambiente em regime de *self service*, aumenta o potencial de contaminação dos produtos expostos e subsequentemente leva ao crescimento da bactéria e possível produção de enterotoxinas, contribuindo para o surgimento de surtos a partir do consumo destes produtos (Smith *et al.*, 2004).

3.6.2.3. Medidas de controlo

Staphylococcus é um microrganismo ubiquitário difícil de eliminar do meio ambiente. Assim que os alimentos são sujeitos à manipulação do homem, em qualquer momento poderá ocorrer a sua contaminação e por sua vez, se existirem condições para que as enterotoxinas sejam produzidas, o posterior processamento térmico não será suficiente para que estas sejam destruídas. Deste modo, é fundamental que para além do cumprimento escrupuloso das regras de boas práticas de manipulação e higiene dos alimentos, se recorra à refrigeração como forma de controlar a multiplicação de *Staphylococcus* e por consequência a produção das suas toxinas (Bergdall, 1989).

A produção de enterotoxinas acontece entre 10 e 45°C de temperatura, sendo que abaixo destes valores a sua produção fica muito limitada, tendo em conta que este processo está dependente das condições ambientais assim como da multiplicação microbiana e esta última, em refrigeração, torna-se bastante lenta (Bergdall, 1989).

O número de surtos de intoxicação alimentar de origem estafilocócica, atribuídos ao consumo de bolos com recheio de creme de natas e de doce de ovos nos EUA teve um acentuado decréscimo nos últimos 10 anos devido à melhoria do saneamento, ao maior

controle de temperatura, à modificação das formulações dos produtos e ao recurso a conservantes alimentares (Elliot, 1980).

Warburton & Weiss (1986) perceberam que os substitutos de recheio de creme em aerossol e as coberturas de natas em pó batidas continham uma quantidade de *S. aureus* < 5 ufc/grama devido às boas práticas de fabrico destes produtos. Foi também demonstrado que o metilparabeno, o benzoato de sódio, o sorbato de potássio e o propionato de cálcio, quando adicionados aos alimentos têm a capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* em condições de pH entre 5.2 - 5.6 e de a_w entre 0,86 - 0.90 (Boylan, Acott & Labuza, 1976). Num estudo desenvolvido por Smith *et al.* (2004), concluiu-se que bolos recheados com creme, mantidos em refrigeração e inoculados com 10^6 ufc/grama de uma estirpe produtora de enterotoxinas de *S. aureus*, não reuniram as condições adequadas ao seu crescimento e por isso as enterotoxinas não foram detectadas. Por sua vez, à temperatura ambiente (27°-29°C) foi possível encontrá-las em bolos inoculados com 10^2 e 10^3 ufc/grama ao fim de apenas 24 e 18 horas respectivamente. Estes resultados evidenciam a importância da refrigeração em bolos recheados, no entanto, uma má gestão das temperaturas é sabido que é comum em produtos de pastelaria recheados com creme (Anunciação *et al.*, 1995).

O embalamento em atmosfera modificada, por si só, não inibe o crescimento nem a produção de enterotoxinas de *S. aureus* (Hintlian & Hotchkiss, 1986). Para produtos de massas frescas embalados em atmosfera modificada, mantidos em refrigeração, com um a_w < 0,95 é recomendada a redução do a_w assim como a do pH, como forma de prevenção adicional ao crescimento desta bactéria (Castelvetri, 1988).

Assim, é essencial um apertado controlo da temperatura de refrigeração ($\leq 4^\circ\text{C}$) dos produtos acabados e dos seus ingredientes para a inibição do crescimento e produção de enterotoxinas de *S. aureus* (Bryan, 1976), como foi demonstrado por um estudo realizado por Bergdall (1989), em que bolos deixados à temperatura ambiente foram responsáveis por intoxicações alimentares, ao contrário de outros armazenados a 4°C que se revelaram seguros para o consumidor.

3.6.3. *Bacillus* spp.

3.6.3.1. Fontes de contaminação

B. cereus foi identificado em vários surtos de intoxicação alimentar que envolveram produtos de pastelaria. Por outro lado, também o *B. subtilis* e o *B. licheniformis*, conhecidos como bactérias deteriorantes do pão, causadores de *rope*, podem causar doença (Kramer & Gilbert, 1989; te Giffel, Beumer, Leijendekkers & Rombouts, 1996; Todd, 1982).

Esta bactéria é causadora de duas formas distintas de gastroenterites mediadas por toxinas: o tipo emético, que está geralmente associado à ingestão de alimentos à base de cereais e o tipo diarreico que ocorre frequentemente associado a alimentos proteicos (Lund, 1990).

As espécies de *Bacillus* spp. formam esporos os quais se encontram em grandes quantidades nos solos, no pó e na água, sendo normalmente isolados a partir de produtos animais e vegetais (Granum, 1997). De acordo com Kirschner & Von Holy (1989), *Bacillus* spp., liga-se ao trigo, o qual é moído para fazer a farinha, sendo este o motivo para que os seus esporos sejam frequentemente encontrados em farinhas, produtos farináceos e consequentemente em ambientes de pastelaria. Estes esporos são resistentes e sobrevivem ao processo de cozedura, ainda que esta sobrevivência dependa do tipo de alimento, das temperaturas internas atingidas durante o processamento térmico e da resistência térmica dos próprios esporos (Smith *et al.*, 2004).

Também já foram encontrados esporos de *Bacillus* spp. no leite, determinando-se assim que estes conseguem sobreviver ao processo de pasteurização, tornando os produtos lácteos tais como natas, leite em pó e concentrados de soro de leite, uma fonte de preocupação (Larsen & Jorgensen, 1997; Slaghuis, Giffel, te Beumer & Andre, 1997; Pirttijarvi, Ahonen, Maunuksela & Salkinoja-Salonen, 1998).

Num estudo realizado por Crielly, Logan & Anderton (1994), verificou-se que embora *B. licheniformis*, estivesse inicialmente em maiores quantidades nos produtos lácteos mantidos à temperatura ambiente, rapidamente o *B. cereus*, dominou e atingiu níveis associados à produção de enterotoxinas. Harmon & Kautter (1991), relataram um aumento de cerca de 7 vezes do valor inicial da quantidade de *B. cereus* no leite em pó magro reconstituído mantido à temperatura ambiente durante 10,5 horas.

As estirpes adaptadas ao frio são capazes de produzir toxinas a temperaturas de refrigeração, particularmente em produtos com elevada concentração de ar na sua mistura, tais como natas batidas (Foegeding & Berry, 1997; Christiansson, Naidu, Nilsson, Wadstrom & Pettersson, 1989).

Especiarias tais como, gengibre, canela, noz moscada entre outras, normalmente contêm baixos níveis de esporos de *Bacillus* spp., no entanto já foram ocasionalmente encontrados altos níveis associados à produção de toxinas nestes ingredientes (Kneifel & Berger, 1994; Pafumi, 1986; Powers, Latt e Brown, 1976). Outros ingredientes amplamente utilizados em produtos de pastelaria que podem ser fontes de *Bacillus* spp. são os ovos em pó, os frutos secos, o cacau, o arroz, o fermento e os aditivos (Hebeda & Zobel, 1996; Aidoo, Tester, Morrison & Macfarlane, 1996; Moreno, Orr, Morales & Weisman, 1985; te Giffel *et al.*, 1996).

3.6.3.2. Surtos associados

De acordo com Lund (1990), os níveis de esporos de *B. cereus* necessários para a produção de toxinas são aproximadamente 10^5 esporos/grama de alimento, enquanto que para *B. licheniformis* e *B. subtilis* são necessários níveis mais elevados, sendo respectivamente 10^6 e 10^9 esporos/grama de alimento. *B. cereus* não consegue sobreviver facilmente à cozedura a que o pão é submetido durante o seu processo de confecção, no entanto, *B. subtilis* é mais resistente às altas temperaturas tendo um valor D (tempo necessário para que a quantidade de microrganismos desça para 10% do seu valor inicial) a 100°C de 14 minutos (Leuschner, O'Callaghan & Arendt, 1998).

Kaur (1986), calculou que seria necessário que o pão fosse mantido a uma temperatura de $27,5^\circ\text{C}$ durante 3 dias para que *B. cereus* resistente ao processo de cozedura atingisse valores de 10^5 esporos/grama. Embora o número de *B. cereus* que sobrevive à cozedura esteja dependente do tamanho do pão e do binómio tempo-temperatura utilizado no forno, o risco de contaminação por ingestão deste produto é mínimo (Smith *et al.*, 2004).

Algumas estirpes de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, causam “ropiness” nos produtos de pastelaria, o que resulta na sua rejeição sensorial. No entanto isto nem sempre acontece, tendo já sido relatados casos de DTA atribuídas ao consumo de pão com altos valores das estirpes referidas que foram organoleticamente aceites pelo consumidor (Sockett, 1991; Thompson, Waites & Dodd, 1993; Todd, 1989).

Embora o pão represente um risco potencial para a saúde muito pequeno, o *B. cereus* pode constituir uma preocupação nos produtos de pastelaria que apenas recebem um tratamento ligeiro pelo calor, como por exemplo, *waffles* ou *queques* entre outros. Nos EUA alguns surtos de gastroenterites causados por *B. cereus* foram relacionados com o consumo de *queques* e *panquecas* (Leela, Sankaran & Vijayaraghavan, 1981; Cowden *et al.*, 1995). É difícil controlar o crescimento deste microrganismo patogénico nestes produtos porque o tratamento pelo calor a que ambos são submetidos é insuficiente para destruir os esporos existentes, podendo mesmo provocar um choque térmico nos esporos capaz de potenciar o seu crescimento em ambientes de armazenamento à temperatura ambiente.

Também no Brasil, *B. cereus* foi relatado como causador de alguns surtos associados à ingestão de bolos com cremes à base de produtos lácteos (Smith *et al.*, 2004).

3.6.3.3. Medidas de controlo

Alguns dos métodos convencionais de controlo de *Bacillus* spp., são a aplicação de um plano de higienização adequado e a realização de análises às matérias-primas, de forma a reduzir a presença inicial de esporos. No entanto estas medidas não eliminam todos os esporos nem previnem a sua germinação e crescimento deste microrganismo em produtos acabados (Smith *et al.*, 2004). O seu crescimento nestes produtos pode ser controlado com o recurso à utilização de conservantes como o ácido propiónico, o propionato de cálcio e

potássio e o acetato de cálcio, que retardam o crescimento de algumas estirpes, em particular, as que provocam o *rope* do pão (Kaur, 1986; Kirschner & Von Holy, 1989; Sadek, El-Zayet, El-Fadeelm & Taha, 1985).

Thompson *et al.*, (1998), identificaram o vinagre como agente mais eficaz na prevenção do *rope* no pão branco relativamente ao propionato de cálcio.

Os valores normais de $D_{100^{\circ}\text{C}}$ para *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* são respectivamente 40, 14 e 56 minutos, o que evidencia a grande resistência térmica dos esporos (Leuschner *et al.*, 1998; Wyatt & Guy, 1981b). Embora a resistência dos esporos ao calor seja influenciada, em parte, pelo pH do produto, estes podem sobreviver sem dificuldade a processamentos térmicos ligeiros.

De acordo com Bassen, Gupta, Jolly & Tewari (1989), o valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ dos esporos de *B. cereus* diminui de 3,7 para 3,1 minutos quando o pH do doce de ovos diminui de 7.2 para 6.2. Também um pH elevado (>9) pode ajudar muito o controlo deste patogénico, mas poucos produtos de pastelaria são formulados com valores tão altos (El-Khoury, 2000; Leuschner *et al.*, 1998).

O armazenamento em refrigeração pode ser uma medida de controlo adequada para alguns produtos tais como os com recheios de natas e doce de ovos. No entanto 14% das estirpes de *B. cereus* são psicotróficas (Granum, 1997). Assim sendo, não é possível confiar apenas no controlo da temperatura para garantir a segurança dos produtos. As coberturas e os recheios devem ser preparados em pequenas doses, arrefecidos rapidamente e armazenados a 4°C (Smith *et al.*, 2004).

Quintavalla & Parolari (1993), equacionaram os efeitos do pH, do a_w e da temperatura no crescimento de *Bacillus* spp., isolados em produtos de pastelaria. Os autores relataram que os produtos armazenados a 20°C com um pH de 5.2 e um a_w de 0,93 apresentaram uma vida útil de 12 a 15 dias, sendo que a sua reformulação para um pH de 4,3 e um a_w de 0.92 aumentou a vida útil dos mesmos para 30 dias, mantendo a mesma temperatura.

3.6.4. *Listeria monocytogenes*

3.6.4.1. Fontes de contaminação

L. monocytogenes é uma bactéria intracelular facultativa, sendo o homem e os animais saudáveis em determinadas circunstâncias portadores assintomáticos deste microrganismo (Hird & Genigeorgis, 1990; Hof, Nichterlein & Kretschmar 1994; ICMSF, 1996b) e é excretada por cerca de 2 a 6% de indivíduos em perfeito estado hígido (Rocourt & Cossart, 1997). É uma bactéria Gram positiva, desprovida de cápsula, não formadora de esporos e anaeróbia facultativa, que se movimenta através de flagelos peritricos se o seu crescimento se verificar entre os 20 a 25°C de temperatura, pois com temperaturas > 37°C a formação destas estruturas é reduzida ou até mesmo nula (Ryser & Marth, 2007).

De acordo com Hird & Genigeorgis (1990), esta bactéria já foi isolada no nariz e mãos de indivíduos saudáveis, assim como no muco vaginal, cervical e sêmen.

Segundo Lorber (1990), embora a Listeriose seja denominada como uma infecção de origem alimentar, não é acompanhada de sintomatologia gastroenterica como acontece na maioria das DTA. Os sintomas são variáveis sendo que os doentes podem apresentar sintomas comuns gripais, endocardites, encefalites ou mesmo quadros septicêmicos (Adams & Moss, 2000).

Este microrganismo patogénico é classificado como psicotrófico podendo por isso desenvolver-se em armazenamento a temperaturas de refrigeração utilizadas para bolos com recheio ou cobertura de creme, de queijo ou de manteiga que são consumidos sem serem previamente aquecidos (Smith *et al.*, 2004). Apesar de existirem diversas fontes de contaminação endógeas e exógenas de *L. monocytogenes* a fonte mais frequente de infecção para o homem é através da ingestão de alimentos contaminados (Hof *et al.*, 1994; Donnelly, 2001).

A natureza ubiqüitária de *L. monocytogenes* em ambientes de pastelaria é uma fonte de preocupação, uma vez que a contaminação dos produtos acabados após a sua confecção é uma possibilidade (Smith *et al.*, 2004). Algumas estirpes de *Listeria* são capazes de sobreviver durante longos períodos de tempo sob condições ambientais adversas e persistir em nichos nos equipamento de processamento alimentar e superfícies associadas (Todd & Notermans, 2011). A capacidade que *Listeria* spp., apresenta na adesão a objectos com diferentes características, sugere que o material de acondicionamento é uma fonte potencial de contaminação de alimentos com esta bactéria (Ryser & Marth, 2007).

Produtos tais como queijos amanteigados, cremes de bolos e manteiga estão associados a surtos de Listeriose (Linnan *et al.*, 1988; Lyytikainen *et al.*, 2000). Os queijos tradicionais de pasta mole (Pintado, Oliveira, Pampulha & Ferreira, 2006) assim como produtos cárneos tradicionais portugueses já foram referenciados como produtos portadores deste microrganismo (Esteves, Patarata, Saraiva, Silva & Martins, 2000; Esteves, Patarata & Martins, 2003).

Assim, os produtos de pastelaria que contêm ingredientes de origem láctea tornam-se merecedores de maior atenção uma vez que podem constituir uma fonte de contaminação de *L. monocytogenes* para o consumidor final (Smith *et al.*, 2004).

De acordo com Farber (1993) existem “Alimentos de baixo risco”, sendo assim classificados por não suportarem a multiplicação de *Listeria*, ou por apresentarem um período de vida útil pequeno e “Alimentos de alto risco” aqueles que permitem um crescimento acentuado da bactéria, pois são constituídos por nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento, disponíveis para o seu consumo, apresentando um período de vida útil longo. Neste grupo estão incluídos todos os alimentos que tenham sido envolvidos em surtos de Listeriose, com destaque para o paté.

Exemplos de “Alimentos de baixo risco” são os queijos de pasta dura, alguns enchidos fermentados e secos e frutos crus assim como alimentos nos quais a existência de *L. monocytogenes* não é frequente tendo em conta as condições de armazenamento e o seu baixo grau de manipulação, como é o caso dos gelados (Jouve, 1994).

3.6.4.2. Surtos associados

Os surtos de *L. monocytogenes* são pouco frequentes quando comparados com os causados por outros microrganismos patogénicos como *Salmonella*. No entanto são alvo de muita atenção quando ocorrem porque normalmente apresentam casos graves que podem resultar em morte, para além do impacto económico que causam, em especial, se afectarem o comércio internacional (Todd & Notermans, 2011). Por exemplo, no Canadá em 2008, um surto relacionado com carne contaminada numa charcutaria custou mais de 43 milhões de dólares (Wordsnark, 2008). Estes surtos são na sua maioria causados por erros cometidos pelos trabalhadores das indústrias alimentares em que cujas fabricas normalmente apresentam violações às regras de boas praticas impostas (Todd & Notermans, 2011).

Gifford, Lorenz & Sofos (1991), analisaram 28 produtos de pastelaria no Canadá com o intuito de pesquisar a presença deste patogénico concluindo que nenhum deles estava contaminado.

Noutro estudo a 300 bolos de 100 pastelarias em França, Ferron & Michard (1993), relataram que 14% dos mesmos estavam contaminados com *L. monocytogenes*. Uma das amostras continha 7×10^5 ufc/grama, quantidade esta, suficiente para causar Listeriose. Os autores concluíram que o risco de contrair Listeriose a partir de bolos é equivalente ao de a contrair a partir de produtos cárneos e de charcutaria.

Ainda assim, a maior parte das infecções por *L. monocytogenes* acontecem sem que haja uma clara ligação a um surto e são considerados “esporádicas” (Varma *et al.*, 2007).

3.6.4.3. Medidas de controlo

Tendo em conta que *L. monocytogenes* consegue crescer entre 0 e 45°C é fundamental controlar a temperatura a que os alimentos são sujeitos a fim de prevenir o seu crescimento. Sendo um microrganismo psicotrófico, as temperaturas de refrigeração, utilizadas em larga escala pela indústria alimentar e em casa dos consumidores retarda mas não inibe o seu crescimento (Ryser & Marth, 2007).

Embora não exista crescimento abaixo de -1,5°C, este microrganismo consegue sobreviver a temperaturas inferiores, portanto, a congelação provoca a inactivação limitada da bactéria mas não a destrói. Deste modo a contaminação dos alimentos congelados deve ser prevenida (Ryser & Marth, 2007).

De acordo com Adams & Moss (2000), a bactéria é facilmente destruída a uma temperatura de 55°C durante 30 minutos ou a 100°C durante cerca de um a dois minutos. No entanto

também se deve evitar manter os alimentos a temperaturas elevadas mas que ainda não provoquem a morte da bactéria, uma vez que esta poderá adquirir resistência a processamentos térmicos posteriores (Ryser & Marth, 2007).

Richter, Weaver, Dorneanu & Cagampang (1991), demonstraram que aquecer farinha inoculada com *L. monocytogenes* durante 5 minutos a 80°C era suficiente para provocar a sua destruição. É assim pouco provável que a bactéria sobreviva à fervura durante a preparação de creme de ovos usados em certos produtos de pastelaria com recheio (Smith *et al.*, 2004).

É essencial que exista um rigoroso controlo de higiene e temperatura para prevenir a contaminação e o crescimento deste microrganismo patogénico. No entanto, visto que é prática comum a deficiente utilização da temperatura na indústria alimentar, esta por si só não confere uma protecção que garanta a segurança de produtos contaminados (Smith *et al.*, 2004).

De acordo com Britz & Robinson (2008), o crescimento de *L. monocytogenes* em biofilmes nas unidades de produção de alimentos pode funcionar como indicador de procedimentos de higienização e desinfecção insuficientes aumentando o nível geral de contaminação da unidade. Deste modo Poimenidou *et al.* (2009), afirmou ser fundamental a aplicação de procedimentos de limpeza e desinfecção com técnicas e produtos adequados, em particular, nos equipamentos de processamento dos alimentos onde os microrganismos podem sobreviver por longos períodos de tempo, tendo em conta os resíduos existentes, a humidade e a temperatura ambiente (Britz & Robinson, 2008). Os resíduos alimentares protegem os biofilmes dos procedimentos de limpeza (Poimenidou *et al.*, 2009).

A capacidade de adaptação a condições de stress que *L. monocytogenes* apresenta, o seu forte potencial de biotransferência assim como o possível aumento da virulência das células que se destacam dos biofilmes previamente formados, tanto nos sistemas de processamento como de distribuição e armazenamento das indústrias alimentares, tornam o controlo desta bactéria um verdadeiro desafio (Bergholz, den Bakker, Fortes, Boor & Wiedmann 2010; Oliveira, Brugnera, Alves & Piccoli 2010; Wiedmann, 2010).

3.7. Os microrganismos e as temperaturas de refrigeração

De acordo com Pruthi (1999), a refrigeração é o processo de remoção de calor de um espaço fechado, com o intuito de diminuir e manter a temperatura desse espaço sob valores inferiores ao da atmosfera circundante.

Segundo Garbutt (1997), o armazenamento de alimentos perecíveis em refrigeração permite garantir a sua conservação por períodos de tempo que podem ir de alguns dias até várias semanas, o que se irá reflectir numa diminuição da taxa de crescimento dos microrganismos presentes nos alimentos e consequente aumento da sua vida útil.

De acordo com Batista & Antunes (2005), os alimentos perecíveis têm como principal característica o facto de se deteriorarem facilmente, podendo o processo de deterioração iniciar-se no ato de aquisição, ou mesmo antes, não prescindindo estes produtos de serem armazenados a baixas temperaturas. A facilidade com que estes alimentos se deterioram deve-se ao facto de serem constituídos por um elevado teor em água e à inexistência de quaisquer outros factores intrínsecos que funcionem como inibidores do crescimento microbiano.

O leite, a carne e peixe frescos, frutas suculentas e relativamente moles são, entre outros, alguns dos alimentos pertencentes a este grupo, que na generalidade são utilizados diariamente na alimentação dos consumidores (Batista & Antunes, 2005). Assim, os alimentos perecíveis, que não são para consumo imediato, deverão ser armazenados a temperaturas entre -1°C e 5°C, em frigoríficos, câmaras frigoríficas ou outro equipamento de frio (INSA, 2007).

A refrigeração é, portanto, uma barreira importante para o controlo do crescimento microbiano (CAC, 1999), no entanto, as falhas na cadeia de frio são muito comuns, pelo que é necessário que o método utilizado para a conservação de alimentos seja baseado em mais do que um factor de controlo (Rybka-Rodgers, 2001).

Likar & Jevsnik (2006), estabeleceram que a cadeia de frio, para alimentos perecíveis deve estar regulada a temperaturas $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

Com base nas temperaturas mínimas, óptima e máxima de crescimento dos microrganismos estes podem ser divididos e classificados em 5 grupos distintos de acordo com o quadro 3.

Tabela 3 – Grupos de microrganismos classificados de acordo com as suas temperaturas de crescimento. (Adaptado de Garbutt, 1997).

Grupos de Microrganismos	Temperatura °C		
	Mínima	Óptima	Máxima
Psicrófilos obrigatórios	-10	10-15	20
Psicotróficos	-10	20-30	42
Mesófilos	5	28-43	52
Termófilos	30	50-65	70
Termófilos extremos	65	80-90	100

A maior parte dos microrganismos mesófilos apresenta uma temperatura óptima de crescimento a 37°C, sendo este o grupo considerado mais importante, pois nele se encontram os microrganismos com taxas de crescimento mais rápidas e na qual estão inseridos a maioria das bactérias patogénicas como *S. aureus* e *Salmonella* spp., os bolores e as leveduras. Este grupo não possui capacidade de crescimento a temperaturas entre -1 a

5°C, sendo esta característica um dado importante para a segurança dos produtos mantidos em refrigeração (Garbutt, 1997).

No que diz respeito aos microrganismos psicrófilos obrigatórios, de acordo com Adams & Moss (2000), os problemas relacionados com este grupo têm vindo a aumentar devido à evolução e desenvolvimento de novas técnicas de conservação pelo frio utilizadas cada vez mais em toda a cadeia alimentar, uma vez que este grupo é o que melhor se adapta a baixas temperaturas. Os organismos psicrófilos obrigatórios conseguem crescer a temperaturas tão baixas quanto -10°C (Garbutt, 1997).

Quanto aos microrganismos psicotróficos, estes ainda são capazes de se desenvolverem entre 0°C e 7°C, sendo a sua temperatura óptima de crescimento compreendida entre os 20°C e 30°C e a máxima a 42°C, no entanto determinados bolores psicotróficos podem ainda crescer a temperaturas tão altas como 58°C (Garbutt, 1997).

Tal como os microrganismos psicrófilos obrigatórios, os psicotróficos também se têm vindo a tornar cada vez mais importantes com a introdução de novas tecnologias de conservação pelo frio em toda a cadeia alimentar (Adams & Moss, 2000).

Por fim, em relação aos microrganismos termófilos, estes têm particular importância em ambientes de processamento específicos, onde as temperaturas atingidas não são suficientes para os destruir, permitindo assim o seu crescimento e permanência (Adams & Moss, 2000). Os termófilos extremos conseguem ser encontrados em alimentos sujeitos a temperaturas superiores a 100°C (Garbutt, 2007).

A refrigeração inibe assim o crescimento dos microrganismos mesófilos, entre os quais se encontram as bactérias patogénicas reflectindo-se este facto no aumento da segurança do produto para o consumidor (Garbutt, 1997). Contudo é fundamental ter em conta que a refrigeração não tornará um produto alimentar inseguro em seguro, uma vez que a capacidade de inactivação deste método sobre os microrganismos é limitada. Além disso, se existirem toxinas pré-formadas, estas irão persistir (Adams & Moss, 2000).

A maioria dos microrganismos necessita de temperaturas superiores a 10°C para a sua multiplicação. Contudo os microrganismos psicotróficos, como já referido, são capazes de se multiplicar numa gama entre 0° e 7°C, ainda que em refrigeração a sua multiplicação ocorra de forma mais lenta. De acordo com Franco & Landgraf (1996) e Sivansakar (2004), a deterioração que ocorre num alimento sujeito a temperaturas superiores a 10°C é cerca de duas vezes mais rápida, do que quando sujeito a temperaturas entre os 0° e 5°C.

Segundo Garbutt (1997), os frigoríficos oscilam entre os 4°C e os 7°C de temperatura, sendo que a estes valores os microrganismos psicotróficos conseguem proliferar, ainda que a uma taxa de crescimento lenta, podendo tornar o alimento potencialmente perigoso para a saúde do consumidor.

De um modo geral, a taxa de crescimento dos microrganismos diminui quando estes são sujeitos a temperaturas de refrigeração. É sabido que muitos patogénicos não conseguem

crescer em condições de temperatura inferiores a 7°C, contudo, bactérias como *L. monocytogenes* conseguem-no a partir dos 3°C (Sergelidis *et al.*, 1997).

As baixas temperaturas a que os alimentos são sujeitos em refrigeração previnem o crescimento selectivo de microrganismos mesófilos conduzindo à formação de uma microflora constituída maioritariamente por psicotróficos (Adams & Moss, 2000).

Por sua vez, a utilização inadequada da refrigeração tem impactos a nível do crescimento dos microrganismos reflectindo-se este facto na segurança do produto e consequente determinação da sua vida útil (Esteves, Macedo, Luz, Soares & Vaz de Almeida, 2002; Ovca & Jevsnič, 2009). Por outro lado, quanto mais baixa for a temperatura de refrigeração maior será o tempo de vida útil de um produto alimentar uma vez que, tal como Franco & Landgraf (1996) e Murmann, Dilkin, Kowalski, Almeida & Mallmann (2004), afirmam, o frio é um dos melhores meios para se manter a coloração, o aroma assim como o aspecto geral dos alimentos. No entanto, o tempo máximo a que um produto deve ser mantido em refrigeração baseia-se em factores microbiológicos, em factores sensoriais como a textura, tenrura, sabor, cor e também na sua qualidade nutricional (Jay *et al.*, 2005).

Durante este tipo de armazenamento, perdas mais ou menos acentuadas de qualidade ocorrem nos alimentos devido a alterações químicas, bioquímicas e físicas, sendo este tipo de alterações que limitam, fundamentalmente, o tempo de vida útil dos produtos refrigerados (Hartel & Heldman, 1997).

De acordo com Silva (1997), a minimização das reacções químicas que provocam a deterioração dos alimentos assim como a inibição da proliferação de microrganismos pode ser alcançada utilizando uma temperatura adequada de refrigeração.

Na tabela 4 estão representados as temperaturas de refrigeração recomendadas para as diferentes categorias de produtos.

Tabela 4 – Temperaturas de refrigeração recomendadas para as diferentes categorias de produtos. (Adaptado de Batista & Antunes, 2005).

Alimento	Temperatura recomendada (°C)
Produtos lácteos	1-8
Ovos	3-4
Frutas e Verduras	7-10
Carne e Peixe cozinhado	1-4
Peixe cru	1-4
Carnes e produtos cárneos crus	1-7

Em suma, a eficácia da refrigeração tem na sua base a redução da actividade dos microrganismos presentes nos alimentos, o que conduz ao retardamento da degradação dos seus componentes e consequente aumento do tempo de vida útil dos produtos. Este tempo

depende da natureza do próprio alimento mas também da contaminação inicial que apresenta, que quanto menor, maior será o seu tempo de vida útil em condições idênticas de conservação (Batista & Antunes, 2005).

3.8. Vida útil de um alimento

3.8.1. Conceito de vida útil de um alimento

De acordo com o *Codex Alimentarius* a vida útil de um alimento é definida como o período de tempo durante a qual o produto alimentar conserva a sua segurança microbiológica a uma dada temperatura de armazenamento (Food Safety Authority of Ireland, 2005).

Já o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de Novembro define este conceito como sendo o período correspondente ao intervalo de tempo que precede a data limite de consumo dos produtos, ou a data de durabilidade mínima, conforme definidas nos artigos 9º e 10º da Directiva 2000/13/CE, de 20 de Março, alterada pela Directiva 2006/142/CE, de 22 de Dezembro e transposta para o actual Decreto-lei n.º 365/2007, de 2 de Novembro que, por sua vez, constitui a alteração do Decreto-Lei nº 560/99, de 18 de Dezembro que, estabelece as regras a que deve obedecer a rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios destinados ao consumidor final (Mendes, 2009).

O Institute of Food Safety & Technology (2007), descreve a vida útil de um alimento como “o tempo durante o qual o alimento é seguro, mantém as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e cumpre com qualquer alegação nutricional, que figure na respectiva rotulagem, quando armazenado nas condições recomendadas”.

Por sua vez, a New Zealand Food Safety Authority (2005), diz que a vida útil de um alimento se inicia quando este é preparado, sendo que a sua duração dependerá de muitos factores como do tipo de ingredientes que o constituem, procedimento produtivo, tipo de embalagem e das condições de armazenamento a que o produto for sujeito.

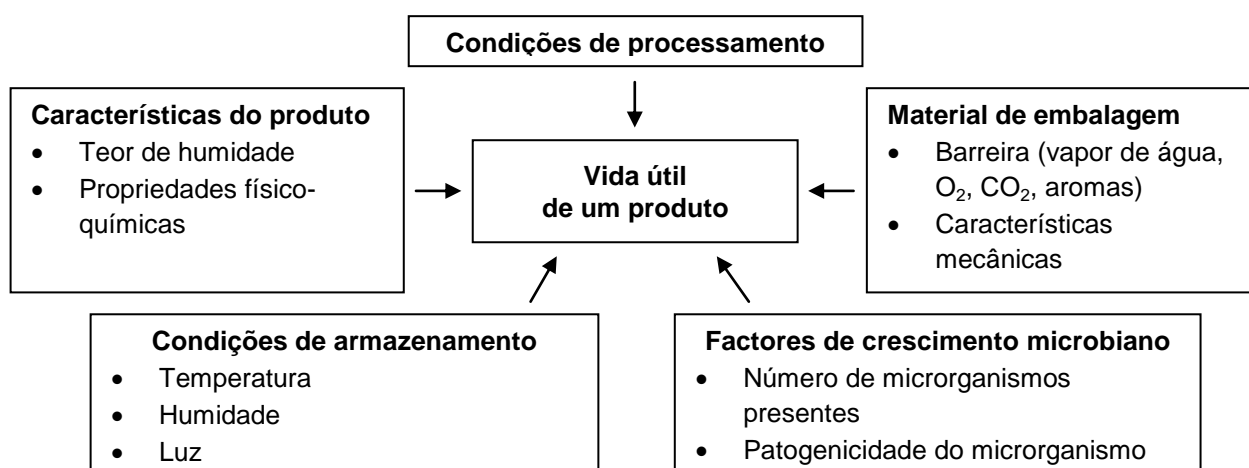
Ledauphin, Pommeret & Qannari (2006) definiram que este conceito seria determinado pela análise da degradação e decomposição microbiana como função do tempo, condições de armazenamento e do tratamento que o produto sofreu.

É assim impossível estabelecer a definição universal deste conceito, uma vez que os mecanismos de alteração dos alimentos são complexos e o consumidor apresenta uma sensibilidade variável aos mesmos (Ledauphin *et al.*, 2006).

3.8.2. Factores que influenciam a vida útil de um alimento

Existem diferentes tipos de condições que limitam a vida útil de um produto alimentar. Esta determinação depende de factores como representados na figura 1 (Galic, Curic & Gabric, 2009).

Figura 1 – Factores que influenciam a vida útil de um produto. (Adaptado de: Galic *et al.*, 2009).



Muitos destes factores deverão ser considerados no plano HACCP, uma ferramenta para o controlo da qualidade que pretende garantir a segurança alimentar dos produtos (Frampton, 1989; Stewart, Cole & Schaffner, 2003; Koutsoumanis, Taoukis & Nychas, 2005).

Todos estes quatro factores são essenciais, mas a sua importância relativa depende da perecibilidade dos alimentos. Em geral, um alimento perecível, quando adequadamente armazenado, tem uma vida útil de menos de 14 dias, a qual é limitada na maioria dos casos pela deterioração química ou microbiológica. Mas fazendo uso de novas tecnologias assépticas e de embalagem com atmosfera controlada, os mesmos alimentos podem durar até 90 dias (Galic *et al.*, 2009).

A vida útil dos alimentos é também afectada pela qualidade microbiológica das matérias-primas, pela formulação do produto, pelas etapas do processamento, embalagem utilizada e das subsequentes temperaturas empregues durante o transporte, armazenamento, exposição, retalho, restauração e uso doméstico (FSAI, 2005).

Assim que o alimento sai da fase de processamento as suas propriedades intrínsecas e o período durante o qual deverá reter todas as suas características passam a estar sujeitos ao microambiente da embalagem. Os parâmetros relevantes são a composição gasosa (oxigénio, dióxido de carbono, gases inertes, etileno entre outros), a humidade relativa (%HR), as pressões e stresses mecânicos, a luz e a temperatura.

Estes parâmetros estão dependentes tanto do embalagem como das condições de armazenamento (Galic *et al.*, 2009).

Outros factores de crescimento não microbiano a considerar são a alteração no teor de humidade de um produto que conduz à perda de nutrientes, o escurecimento ou rancificação. No que diz respeito a alimentos secos, um aumento no teor de humidade predispõe a um aumento da susceptibilidade à degradação microbiana (Li, Wick & Marriott, 1999; Fan, Niemira & Sokorai, 2003).

A degradação química pode resultar numa alteração das características sensoriais do produto, como o cheiro, sabor e cor e ainda a perda de nutrientes (Li *et al.*, 1999).

A exposição à luz conduz à rancificação do produto, à perda das suas vitaminas e respectiva cor (Henriques, 2008).

De acordo com a *Food Safety Authority of Ireland* (2006), existem muitos factores não microbianos que alteram a qualidade dos alimentos e que mesmo que não resultem numa perda de segurança do produto podem indicar que este deixou de satisfazer determinados requisitos aos olhos do consumidor.

Em relação aos factores de crescimento microbiano, segundo Mekalanos (1992) e Rodgers (2004), estes vão estar dependentes da quantidade inicial de microrganismos presentes num determinado alimento, assim como da contaminação que poderá ocorrer durante o processo de manipulação, embalamento e armazenamento. Este crescimento microbiano vai estar dependente do tempo necessário para que os microrganismos presentes degradem o produto (Henriques, 2008).

3.8.3. Determinação da vida útil de alimentos

A Legislação actual não fornece protocolos *standard* para o estabelecimento do tempo de vida útil dos produtos alimentares, no entanto estão publicadas várias guias nacionais e internacionais para este propósito (FSAI, 2005; Health Protection Agency, 2009; NZFSA, 2005; Refrigerated Foods Association, 2009). Estas guias sugerem diferentes protocolos de métodos e análises para o estabelecimento do tempo de vida útil sendo principalmente focados em alimentos prontos a consumir (Valero, Carrasco & García-Gimeno, 2012).

Dependendo da natureza do alimento existem várias propriedades ou índices de qualidade que têm de ser testados ao longo de um determinado período de forma a avaliar o ritmo de degradação da qualidade do produto em termos das suas propriedades sensoriais, microbiológicas e físico-químicas (Labuza, 1982; Labuza, 1985; Hozov'a, Kukurov'a, Turicov'a & Dodok, 2002).

De acordo com Rybka-Rodgers (2001), um estudo de vida útil é uma determinação objectiva e metódica do período de conservação espectável para um determinado alimento. As empresas do sector alimentar, responsáveis pelo fabrico de alimentos, devem, portanto, realizar estudos para verificação da conformidade dos seus produtos com os critérios microbiológicos, ao longo de toda a vida útil do produto, em particular, nos alimentos prontos a consumir (FSAI, 2005).

De acordo com Rodgers (2004), após o primeiro estudo de vida útil de um produto deverão seguir-se outros, os quais poderão reajustar os definidos anteriormente, pelo que é mais correto falar-se em monitorização da vida útil.

Segundo Costa & Kristbergsson (2009), os estudos de vida útil podem ser efectuados através de testes directos ou indirectos, sendo que os primeiros se baseiam no

armazenamento dos produtos em condições idênticas às verificadas na realidade. Ao longo deste período são observadas as alterações que ocorrem no alimento determinando-se assim, o tempo que decorre até ao limite em que o mesmo se torna impróprio para consumo (Man, 2004; Corradini & Peleg, 2007).

Man (2004) afirma que um estudo de vida útil não consegue ser formulado de maneira a cobrir todas as eventualidades. Por exemplo, a simulação de determinadas condições durante a distribuição, essencialmente das resultantes das movimentações dos consumidores são difíceis de mimetizar, sendo que a grande maioria dos estudos é realizada em condições fixas de armazenamento. No entanto, a simulação de condições extremas também é discutível, uma vez que estas podem apresentar uma larga gama de combinações e são imprevisíveis (Corradini & Peleg, 2007).

No que diz respeito aos estudos de vida útil através dos métodos indirectos, estes incluem o cálculo do tempo de vida útil dos alimentos com base em dados já publicados por entidades idóneas e internacionalmente reconhecidas, na utilização de tempos conhecidos para produtos semelhantes e até mesmo nas reclamações e queixas por parte dos consumidores, como ponto de referência para determinar a ocorrência de problemas nos mais variados alimentos (Corradini & Peleg, 2007). Contudo, estes métodos indirectos apresentam diversas limitações, tais como o facto de não existirem dois produtos precisamente iguais no mercado, assim como os dados de análise do tempo de vida útil dos mesmos serem sigilosos. Para reforçar a limitação destes métodos, não existe, na maioria das vezes, qualquer reclamação por parte do consumidor sobre o produto em estudo (Corradini & Peleg, 2007), sendo tais limitações a causa principal da utilização mais frequente dos métodos directos relativamente aos indirectos nos estudos de vida útil (Man, 2004).

Nos dias de hoje, para muitos produtos, é esperado um tempo de vida útil de várias semanas ou até meses, ao invés do tempo que os fabricantes dos géneros alimentícios têm para determinar este mesmo tempo (Hough, Guaritta & Gómez, 2006). Perante esta pressão surgiram os testes de aceleração da vida útil, uma metodologia utilizada para determinar a vida útil de um produto (Labuza, 2000). No entanto os seus resultados muitas vezes são mal interpretados. Estes testes consistem em armazenar o produto na respectiva embalagem sob condições não adequadas, examinando-o periodicamente até atingir o fim da sua vida útil. Obtidos os resultados, estes servirão para projetar a vida útil do produto nas condições reais de armazenamento (Labuza, 2000).

De acordo com Labuza (2000), este método apresenta algumas limitações. É necessária precaução ao interpretar os resultados obtidos e a sua extrapolação para outras condições. Por exemplo, quando o sistema produto/embalagem é testado, a embalagem desempenha um controlo fundamental na determinação da vida útil do alimento que protege, de tal modo que esta muitas vezes é desconhecida. Assim se for escolhida uma nova embalagem com

diferentes permeabilidades ao oxigénio, água e dióxido de carbono os resultados anteriores poderão não ser fidedignos (Labuza, 2000).

Contudo, se as condições deste teste forem bem escolhidas e se forem utilizados os algoritmos apropriados para a sua extrapolação é possível conseguir prever a vida útil de diversos produtos sob quaisquer condições de armazenamento conhecidas. Estas previsões são feitas com base nos princípios do modelo de perda de qualidade dos alimentos (Labuza, 2000).

Seleccionar a aproximação adequada e confiável para modelar a perda de qualidade de um produto alimentar é um primeiro passo importante na estimativa do seu tempo de vida útil permitindo a utilização de um padrão eficiente de testes apropriados (Singh & Cadwallader, 2002).

Relativamente a outros métodos mais recentemente utilizados na determinação da vida útil dos produtos alimentares, destaca-se a microbiologia preditiva baseada na utilização de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos. Este método permite prever o tipo, o teor e a evolução dos microrganismos potencialmente presentes num determinado alimento mantido sob condições conhecidas (Nakashima, André & Franco, 2000).

De acordo com FSAI (2005), os modelos matemáticos preditivos são particularmente úteis nas fases primordiais de desenvolvimento da formulação de um dado produto, para fornecimento de uma estimativa do seu tempo de vida útil.

Podem ainda utilizar-se os testes desafio, que estabelecem e validam a segurança dos produtos alimentares, considerando determinada vida útil (NZFSA, 2005). Neste tipo de teste, um alimento é inoculado com um agente patogénico conhecido ou não-patogénico com características semelhantes às do patogénico. Após a inoculação o alimento é mantido em condições de armazenamento, distribuição e utilização semelhantes à realidade e é avaliado o crescimento dos microrganismos inoculados (FSAI, 2005).

No que diz respeito à duração de um estudo de vida útil, este deve ser prolongado até à data limite pretendida. Ao longo deste período devem ser realizados testes microbiológicos e, se ao fim da data limite pretendida os critérios ainda estiverem aceitáveis, a determinação deve ser prolongada até que os resultados obtidos nas análises deixem de ser aceitáveis (FSAI, 2005). Importa salientar, que alimentos perecíveis podem requerer testes com intervalos diários, ao passo que alimentos menos perecíveis podem apenas exigir testes com intervalos semanais, sendo que a natureza dos alimentos exerce assim uma grande influência na determinação da frequência da amostragem (FSAI, 2005).

3.8.4. Evolução da necessidade da determinação de vida útil

O facto de os alimentos serem sistemas diversos, complexos e activos, em que as reacções microbiológicas, físico-químicas e enzimáticas ocorrem simultaneamente, faz com que o seu estudo se torne uma tarefa árdua (Singh & Cadwallader, 2002).

A motivação para a indústria alimentar e de bebidas alcançar uma qualidade mais elevada e estender a vida útil dos produtos, foi iniciada nos anos 90. Alguns dos factores que contribuíram para a investigação e melhoria do tempo de vida útil estiveram associados a um crescimento da demanda do consumidor por alimentos frescos, convenientes, seguros e de qualidade superior, disponíveis durante todo o ano, assim como a globalização contínua de sistemas de distribuição alimentar (Singh & Cadwallader, 2002).

Perante esta situação foi exercida pressão sobre a indústria alimentar no sentido de assegurar a estabilidade do tempo de vida útil dos produtos assim como o seu tempo de armazenamento uma vez que, hoje em dia, os produtos são transportados para cada vez mais longe do seu local de origem (Singh & Cadwallader, 2002).

Ainda que com o recurso a técnicas de embalagem inovadoras, novas tecnologias e métodos melhorados de testes estimularam alguns objectivos bem sucedidos por parte de alguns profissionais conseguindo estender a vida útil de produtos tais como saladas frescas cortadas. Outras pressões emergentes requerem a necessidade de obter uma melhoria dos testes para determinação do tempo de vida útil assim como novos procedimentos de assessoria (Singh & Cadwallader, 2002).

3.8.5. Vida útil e vida útil sensorial de um alimento

A vida útil de muitos alimentos é também determinada pela sua vida útil sensorial. As metodologias para calcular a vida útil sensorial no fabrico de alimentos, desenvolvem-se de forma a estudar a influência das alterações nos processos de formulação e fabrico (Giménez, Ares & Gámbaro, 2008).

Para além disso é necessário uma informação precisa do tempo de vida útil de forma a aumentar o tempo de comercialização de um produto para o máximo, mas garantindo a frescura do mesmo. Encontrar produtos inaceitáveis dentro do seu prazo de vida útil pode diminuir a confiança dos consumidores tanto no alimento como no estabelecimento que o vende (Harcar & Karakaya, 2005). Deste modo, a vida útil definida para um produto deverá ser a razoável e não a ideal, sendo que as variações possíveis na produção, armazenamento, distribuição, utilização e das características intrínsecas e extrínsecas do alimento, devem ser consideradas quando se aplica a margem de segurança (FSAI, 2005).

Geralmente, a vida útil sensorial de um alimento é definida como o tempo necessário para um determinado atributo sensorial alcançar uma intensidade pré-determinada, normalmente denominada como critério de falha (Hough *et al.*, 2002). Os critérios de falha são escolhidos ao acaso, sem quaisquer estudos para apoiar a sua validade ou para correlacionar esses limites sensoriais com a percepção dos consumidores (Giménez *et al.*, 2008).

De acordo com Hough, Langohr, Gómez & Curia (2003), os produtos alimentares não têm uma vida útil sensorial própria mas, pelo contrário, esta encontra-se dependente da interacção do produto com o consumidor.

Os consumidores são quem decide se aceitam ou não um alimento após um determinado tempo de armazenamento e por esta razão, são considerados a ferramenta mais apropriada para determinar a vida útil sensorial de um produto alimentar (Hough *et al.*, 2003).

Diferentes metodologias podem ser usadas para determinar a vida útil de um produto utilizando a informação proveniente do consumidor. Esta pode ser definida como sendo o tempo necessário para pontuações de aceitabilidade global de um produto caírem abaixo de um valor pré-determinado ou critério de falha, por exemplo, um valor atribuído de 6 numa escala hedónica estruturada de 9 pontos (Munoz, Civille e Carr, 1992; Giménez *et al.*, 2007).

Nesta metodologia os critérios de falha são seleccionados com base na percepção do consumidor em relação a um determinado alimento e não com base na informação de assessores treinados (Giménez *et al.*, 2008).

De acordo com Hough *et al.* (2003), é possível aplicar-se a análise de sobrevivência de modo a estimar-se a vida útil sensorial de um produto baseada na rejeição dos consumidores.

Esta metodologia centra-se no risco de rejeição do produto ainda dentro da sua vida útil por parte dos consumidores, apresentando-se como sendo o tempo necessário para atingir uma percentagem pré-determinada de rejeição, normalmente 25 a 50% (Hough *et al.*, 2003; Gámbaro, Giménez, Varela, Garitta, & Hough, 2005; Gámbaro, Ares & Giménez, 2006; Ares, Parentelli, Gámbaro, Lareo & Lema, 2006; Giménez *et al.*, 2007). Estas percentagens significam que se o consumidor ingerir o produto no final da sua vida útil há uma probabilidade de entre 25 a 50% de este ser rejeitado. No entanto isto pode não servir como garantia suficiente para assegurar a frescura e a qualidade de um produto perto do final da sua vida útil (Giménez *et al.*, 2008).

De acordo com Gardial, Clemons, Woodruff, Schumann & Burns (1994) e Ragaert, Verbeke, Devlieghere & Debevere (2004), durante o seu processo de decisão os consumidores apoiam-se em diferentes atributos antes de decidirem comprar ou consumir um determinado alimento. Para além disso os critérios de avaliação de um produto podem mudar dependendo da altura em que estão a pensar consumi-lo.

Por esta razão os consumidores podem ser mais tolerantes aos defeitos dos produtos se estiverem a pensar consumi-los depois de armazenados nas suas casas do que imediatamente após a compra (Giménez *et al.*, 2008).

Também Roca, Broyart, Guillard, Guilbert & Gontard (2008), afirmam que os critérios de avaliação podem mudar dependendo da tomada de decisão do consumo do produto. Assim, a vida útil estimada de um produto pode variar se os consumidores questionados estão a pensar consumi-lo de imediato após a compra ou algum tempo depois de armazenado nas suas casas (Roca *et al.*, 2008).

Os fabricantes estão interessados em vender produtos dentro das suas vidas úteis e que agradem os consumidores. No entanto estes podem aceitar consumir um produto sem que desfrutem dele. Portanto, é necessária uma metodologia para assegurar que os consumidores continuam a gostar do alimento mesmo no final da sua vida útil (Giménez *et al.*, 2008).

Na escala hedónica de 9 pontos normalmente utilizada, um valor de 5 indica “nem gosta nem desgosta”. Assim, 6 é o primeiro valor indicativo de que o consumidor gosta do produto. Por esta razão um resultado entre 6 e 9 pode ser visto como positivo (Giménez *et al.*, 2008). Em suma, para a determinar o tempo de vida útil dos alimentos existe uma importância acentuada na avaliação sensorial dos mesmos. É comum os alimentos não se deteriorarem em função do crescimento microbiano (e supondo um correto armazenamento) e tendo em conta este facto, o prazo de vida útil é determinado por alterações sensoriais (Fu & Labuza, 2000; Brown, 2006).

4. ESTUDO DESENVOLVIDO

4.1. Enquadramento e justificação do estudo

O objectivo principal do presente estudo foi a determinação da vida útil de dois bolos *cake-design* com recheios distintos, um com mascarpone e frutos silvestres e outro de doce de ovos. Ambos os bolos, independentemente do recheio, são constituídos por massa de chocolate e uma cobertura de massa de açúcar elaborada e trabalhada que caracteriza a arte inerente ao *cake-design*.

Os bolos são confeccionados por uma empresa, que se lançou recentemente no mercado estando a ponderar abrir num futuro próximo um espaço a funcionar como ponto de venda e onde irão realizar formações sobre a arte de fabrico destes bolos.

Diariamente, aquando do momento da encomenda e venda, questões como “onde conservar o bolo?”; “em quanto tempo pode ser consumido?” São colocadas pelos clientes aos fabricantes.

Nos dias de hoje é fundamental saber responder a todas as necessidades e exigências do consumidor, sendo uma obrigação moral e legal para os fabricantes de géneros alimentícios oferecer produtos seguros que não ponham em causa a saúde de quem os vai consumir.

A obrigação moral baseia-se na definição de regras que são à partida, assumidas pelo consumidor, como uma maneira de garantir o seu bem-estar aquando do momento de compra de um dado produto alimentar, sendo que esse pressuposto uma vez quebrado levará à quebra de confiança por parte do consumidor e consequentemente ao insucesso do fabricante.

Quanto à obrigação legal o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de Novembro estabelece que os géneros alimentícios não devem conter microrganismos nem as suas toxinas e metabolitos em quantidades que representem um risco inaceitável para a saúde humana. Este Regulamento define o período de vida útil de um alimento como o “período correspondente ao intervalo de tempo que precede a data limite de consumo dos produtos, ou a data de durabilidade mínima, conforme definidas nos artigos 9º e 10º da Diretiva 2000/13/CE”. De acordo com esta Diretiva, a vida útil de um género alimentício corresponde à data até à qual este mantém as suas propriedades específicas, considerando o seu armazenamento de forma adequada. Esta Diretiva define e estabelece em que circunstâncias são mencionadas na rotulagem dos géneros alimentícios a data limite de consumo e a data de durabilidade mínima. No entanto, não há menção relativamente aos critérios como são determinadas as referidas datas, subentendendo-se que a responsabilidade da sua determinação cabe ao fabricante do produto. Apesar de não existir nenhum sistema de atribuição de validade oficialmente recomendado, existe a obrigatoriedade legal de mencionar o prazo de validade dos alimentos na respectiva rotulagem.

No entanto, uma vez que os bolos em estudo não são produtos pré-embalados, não têm a obrigatoriedade legal de conter um rótulo, mas para que sejam comercialmente viáveis, os fabricantes devem ser capazes de produzir alimentos aceitáveis do ponto de vista da sua segurança microbiológica, segundo o Regulamento (CE) n.º 178/2002, de 28 de Janeiro estabelece os requisitos gerais de segurança dos géneros alimentícios, segundo os quais não devem ser colocados no mercado géneros alimentícios que não sejam seguros.

Assim, foi considerado fundamental determinar a vida útil destes bolos sujeitando-os a dois armazenamentos distintos, um à temperatura ambiente e outro em refrigeração, com o intuito de simular ambas as possibilidades em casa do consumidor. Consoante a situação de armazenamento foi determinada a vida útil de cada bolo com base na garantia da segurança alimentar.

Fundamental será que os consumidores respeitem os prazos de vida útil indicados pelos fabricantes, para cada tipo de recheio, consoante mantenham os bolos em refrigeração ou à temperatura ambiente.

Neste sentido, numa primeira fase do estudo, foram realizadas análises microbiológicas e sensoriais aos bolos de cada recheio. As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de Tecnologia Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária assim como a prova sensorial. O painel de provadores que se conseguiu reunir foi constituído por trabalhadores e alunos da Faculdade que se disponibilizaram a colaborar com esta parte do trabalho.

Numa segunda fase, obtidos os resultados microbiológicos, estes foram comparados com os Valores Guia propostos pelo INSA (2005) e com os valores legais definidos no Regulamento (CE) N.º 2073/2005, de 15 de Novembro e deste modo, procedeu-se à classificação de qualidade microbiológica do produto em Satisfatório, Aceitável, Não Satisfatório e Inaceitável/potencialmente perigoso.

Concluída a segunda fase, avançou-se para a terceira e última fase deste estudo, que consistiu em cruzar as classificações atribuídas à qualidade microbiológica de cada bolo nos diferentes tempos de estudo com as informações obtidas nas provas sensoriais, na tentativa de se estabelecer uma validade que irá assegurar a qualidade e segurança do produto, garantindo o sucesso de vendas sem reclamações.

Foi à determinação do tempo de vida útil deste bolos, que o presente trabalho se dedicou.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Caracterização do produto em estudo

Os produtos objecto de estudo do presente trabalho são dois bolos do tipo *cake-design*. São ambos constituídos por massa de chocolate em cuja composição se incluem farinha, leite, açúcar, fermento, ovos frescos e óleo vegetal. A sua cobertura é composta por uma densa camada de pasta de açúcar. Em relação aos recheios, um dos bolos apresenta queijo mascarpone e frutos silvestres e o outro recheio de doce de ovo. Neste último, são utilizados ovos pasteurizados ao invés do que acontece na confecção da massa dos bolos.

Maioritariamente estes bolos são vendidos para aniversários, essencialmente de crianças. Os bolos utilizados (figura 2) são comercializados em caixas de cartão e até agora, os fabricantes não possuíam dados sobre a data de validade a indicar. Esta era aconselhada aos clientes, com base na intuição e experiência obtida essencialmente através das características organoléticas observadas no produto com a evolução do tempo.

Conservar no frigorífico este tipo de bolos, dadas as suas dimensões, pode tornar-se uma tarefa bastante complicada para além de que a textura da massa de açúcar sofre alterações organoléticas negativas perceptíveis ao paladar.

O recheio de mascarpone e frutos silvestres foi escolhido por não sofrer qualquer tipo de processamento térmico, constituindo deste modo, um maior perigo potencial para a saúde do consumidor; o recheio de doce de ovo foi escolhido por ser o mais vendido por esta empresa. Em relação à massa dos bolos, a escolhida foi a de chocolate, também por ser a mais vendida.

A empresa que fabrica estes bolos é constituída por dois funcionários, encontrando-se o responsável de produção a frequentar um curso superior na área de pastelaria.

Figura 2 – Bolo com recheio de doce de ovo (à esquerda) e bolo de mascarpone e frutos silvestres (à direita).



O modo de fabrico do bolo com recheio de mascarpone e frutos silvestres está ilustrado na figura 3 e o de doce de ovos na figura 4.

Figura 3 – Fluxograma de Fabrico do bolo com recheio de mascarpone e frutos silvestres.

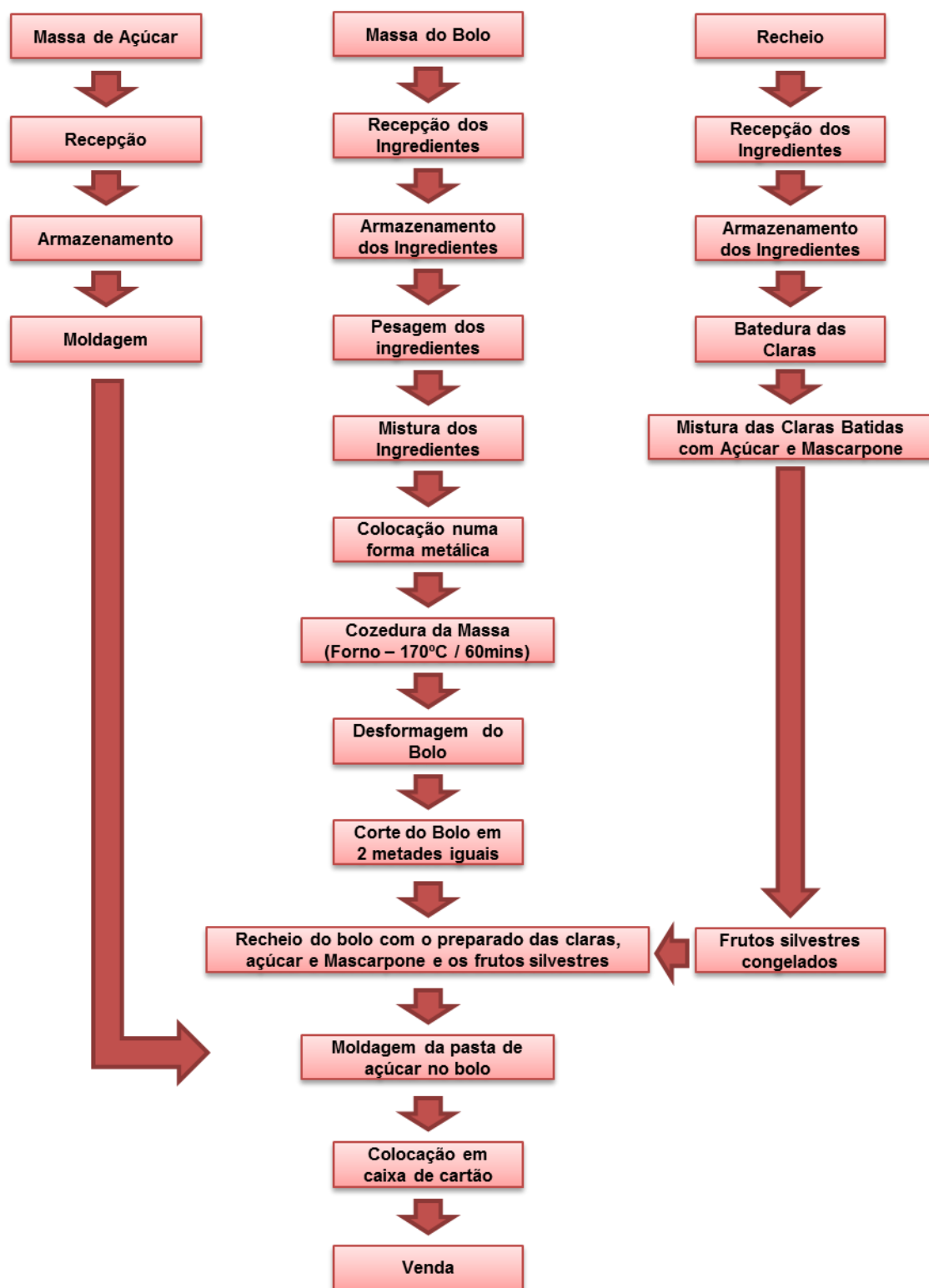
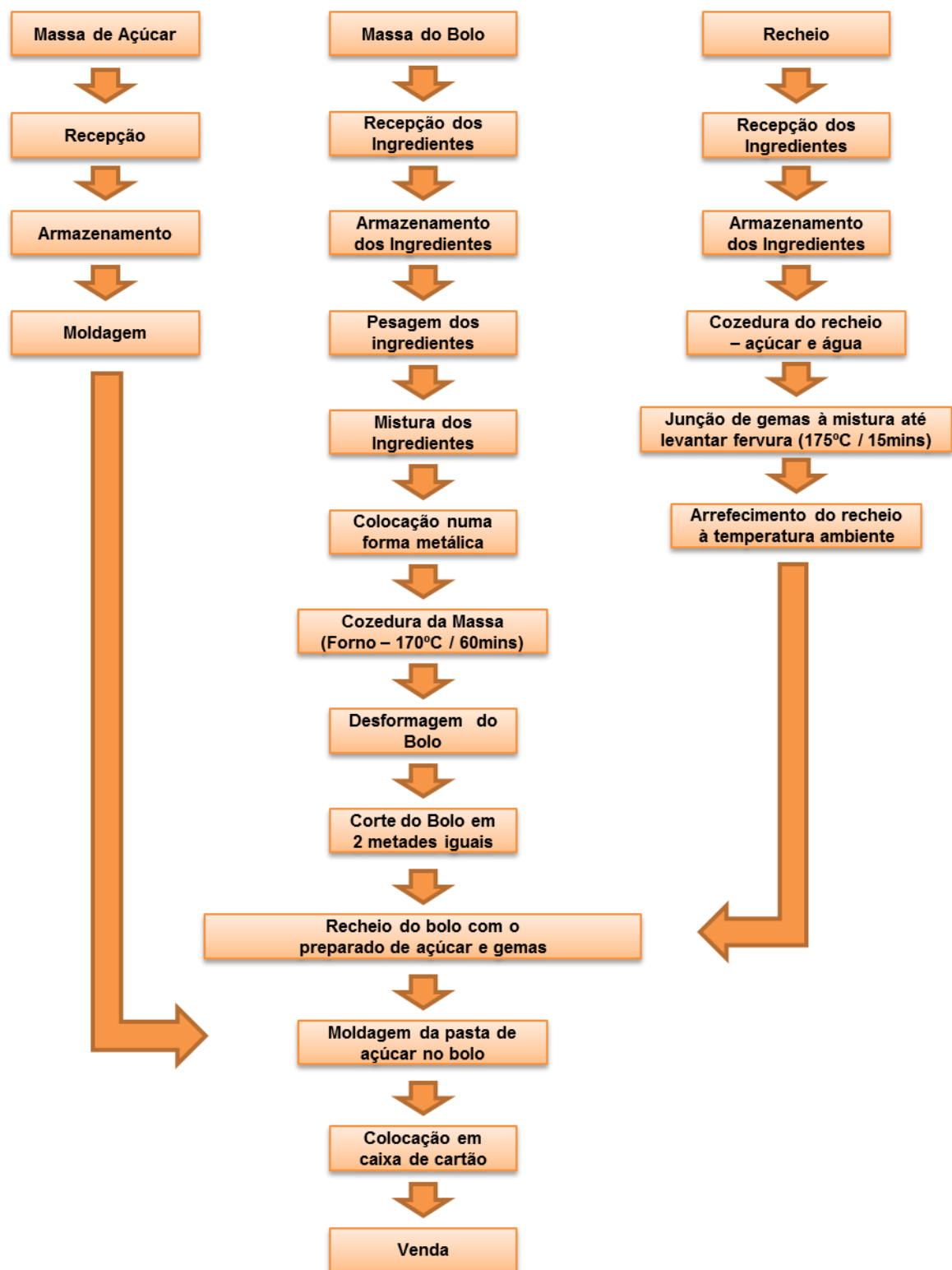


Figura 4 – Fluxograma de Fabrico do bolo com recheio de doce de ovos.



4.2.2. Caracterização das amostras

Como já referido, estes bolos apresentam normalmente duas limitações à sua colocação no frigorífico, uma devido às grandes dimensões que os bolos *cake-design* atingem e a outra, pela alteração de textura que a pasta de açúcar que os reveste e enfeita, sofre se mantida em refrigeração.

Contudo, embora com estas limitações, estudou-se também o bolo em refrigeração com o intuito de comparar o seu tempo de vida útil com o dos bolos mantidos à temperatura ambiente. Os bolos mantidos à temperatura ambiente foram conservados sob duas condições, uma simulando a abertura e consumo no dia de fabrico e depois a respectiva manutenção ao longo do tempo, e a outra simulando a exposição ao longo do tempo antes da venda e do corte. Para além de ser esperado que o bolo refrigerado alcançasse um tempo de vida útil mais longo relativamente aos bolos armazenados à temperatura ambiente, esperava-se também, que o bolo aberto no dia de confecção tivesse um tempo de vida útil mais reduzido em relação ao mantido fechado, uma vez que a pasta de açúcar, para além do efeito decorativo, desempenha um papel protector sobre a massa do próprio bolo e respectivo recheio, limitando, de certo modo, eventuais contaminações e/ou o desenvolvimento rápido de microrganismos. Além disso, o corte com utensílios e a manipulação dos bolos implica, inevitavelmente, contaminação microbiológica.

Assim, para simplificar a compreensão deste trabalho foram atribuídos os seguintes códigos aos bolos:

Bolo A- bolo aberto e analisado no dia da sua confecção (T0) e mantido à temperatura ambiente. Após três dias (T1) e ao final de seis dias (T2) fizeram-se novas análises. O bolo foi aberto no dia da sua confecção e manteve-se à temperatura ambiente até ao último momento de análise do estudo (T2).

Bolo B- conjunto de dois bolos mantidos fechados à temperatura ambiente, até ao momento de análise, um três dias após confecção (T1) e o outro, seis dias após confecção (T2). Ambos se mantiveram fechados até ao momento em que foram analisados.

Bolo C- bolo armazenado em refrigeração, analisado seis dias após a sua confecção (T2). Este bolo foi colocado no frigorífico no dia do seu fabrico e assim se manteve até ao momento em que foi sujeito a análise.

Ambos os recheios foram estudados em simultâneo.

Os bolos foram obtidos no dia da sua confecção, sendo todos constituídos por massa de chocolate, recheio e uma densa cobertura de pasta de açúcar. Foram confeccionados 4 bolos com recheio de mascarpone e frutos silvestres e outros 4 com recheio de doce de ovo, perfazendo um total de 8 bolos analisados em cada uma das 3 repetições do estudo.

O presente trabalho consistiu num estudo constituído por três repetições consecutivas.

No momento T0 apenas se analisou o bolo A de cada recheio.

Em T1, foi analisada uma amostra dos bolos A abertos há 3 dias e uma dos bolos B, abertos na altura.

No momento T2 foi novamente analisada uma amostra dos bolos A (6 dias de exposição, abertos), outra dos bolos B (6 dias de exposição, fechados) e uma terceira dos bolos C (6 dias em refrigeração, fechados).

A avaliação das características microbiológicas e sensoriais das amostras, foi realizada durante 6 dias incluindo o dia do seu fabrico. Foram avaliados, ao longo de todo o estudo desenvolvido, 6 lotes de bolos, 3 com recheio de mascarpone e frutos silvestres e 3 com doce de ovo, produzidos em dias diferentes conforme é possível verificar na tabela 5.

A data de fabrico dos bolos que constituíram cada lote está presente na tabela 5, assim como os momentos de cada análise.

Tabela 5 – Delineamento experimental do trabalho desenvolvido ao longo de três de semanas de estudo.

Produto alimentar – Bolo	Data de produção do Bolo	Momento de análise
Bolo A com Doce de Ovos	06-03-2012	T0,T1 e T2
	13-03-2012	T0,T1 e T2
	20-03-2012	T0,T1 e T2
Bolo A com Mascarpone e Frutos Silvestres	06-03-2012	T0,T1 e T2
	13-03-2012	T0,T1 e T2
	20-03-2012	T0,T1 e T2
Bolo B com Doce de Ovos	06-03-2012	T1 e T2
	13-03-2012	T1 e T2
	20-03-2012	T1 e T2
Bolo B com Mascarpone e Frutos Silvestres	06-03-2012	T1 e T2
	13-03-2012	T1 e T2
	20-03-2012	T1 e T2
Bolo C com Doce de Ovos	06-03-2012	T2
	13-03-2012	T2
	20-03-2012	T2
Bolo C com Mascarpone e Frutos	06-03-2012	T2
	13-03-2012	T2
	20-03-2012	T2

T0= dia de confecção; T1= três dias após confecção; T2= seis dias após confecção

4.2.3. Análises microbiológicas

A presença de microrganismos potencialmente patogénicos nos alimentos nem sempre significa um perigo para a saúde do consumidor, pelo que é fundamental determinar que tipo microrganismos estão presentes e em que quantidade. Para a determinação da vida útil de um produto alimentar a evolução da flora microbiana é um factor preponderante, sendo por isso de extrema importância o seu estudo.

4.2.3.1. Preparação da amostra

A preparação das amostras foi realizada de acordo com a Norma Portuguesa 2079 de 1989. A metodologia seguida para a obtenção das amostras foi sempre a mesma, independentemente das condições a que os diferentes bolos estiveram sujeitos. Pesou-se 10 gramas representativas de produto, tentando-se colher equitativamente a massa de açúcar, bolo de chocolate e o respectivo recheio, com os devidos cuidados de assepsia, para o interior de um saco esterilizado de “Stomacher”. Adicionaram-se 90 ml de Tripton Sal esterilizada, à amostra pesada e procedeu-se à homogeneização durante cerca de 1 minuto num homogeneizador Stomacher Lab-Blender 400. Obteve-se deste modo a suspensão inicial (10^{-1}).

4.2.3.2. Preparação das diluições

A preparação das diluições para o estudo efectuado foi realizada de acordo com a Norma Portuguesa 3005 de 1985.

De modo a tornar possível a contagem de microrganismos existentes numa quantidade conhecida de produto, foram efectuadas diluições decimais sucessivas para redução do número de microrganismos por unidade de volume a partir do produto alimentar.

4.2.3.3. Contagem de Microrganismos aeróbios totais a 30°C

A análise para a determinação do número de microrganismos aeróbios totais a 30°C foi efectuada segundo a Norma Portuguesa 4405 de 2002.

A partir das diferentes diluições decimais realizadas anteriormente, retirou-se 1ml de inóculo que se semeou por incorporação, no meio de cultura TGE (Tryptona Glucose Extract Agar, Scharlau Chemie, Espanha).

As contagens das colónias foram realizadas após incubação a 30°C durante 48 horas, em aerobiose. Os resultados foram expressos em ufc/g (unidades formadoras de colonias por grama).

4.2.3.4. Contagem de *Enterobacteriaceae*

Para a sua contagem realizou-se como descrito na Norma Portuguesa 4137 de 1991, sementeiras a partir das diferentes diluições decimais, através da incorporação de 1ml de inóculo em meio de cultura VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar, Sharlau, Espanha), deixando-se o meio solidificar durante cerca de 15 minutos, colocando em seguida as placas na estufa a 37°C.

A contagem das colónias características (coloração rosa a vermelha, com ou sem halo de precipitação de sais biliares) foi realizada após incubação a 37°C durante 48 horas, em aerobiose, em concordância com a norma acima referida.

Os resultados foram expressos em ufc/g.

4.2.3.5. Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo

A contagem de *S. aureus* foi realizada por sementeira e espalhamento em superfície no meio Baird-Parker (Merck, Alemanha) de 0,1 ml de inóculo da suspensão inicial em placa de Petri. O meio foi enriquecido com solução de gema de ovo, com telurito de potássio. Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

A contagem de colónias presentes foi efectuada com base em dois critérios: colónias características (pretas ou cinzentas, convexas, brilhantes de diâmetro compreendido entre 1 e 2,5 mm de diâmetro, rodeadas de um halo claro) e colónias não características (semelhantes na aparência às colónias características, mas sem halo claro). As colónias suspeitas foram repicadas para caldo BHI ("Brain Heart Infusion", Scharlau, Espanha) incubando-se novamente a 37°C durante 24 horas, efectuando-se posteriormente a prova da catalase com plasma de coelho liofilizado (Biomerieux, França).

Os resultados foram expressos em ufc/g.

O método horizontal para detecção e enumeração de *S. aureus*, foi efectuado conforme a Norma ISO 6888-1 de 1999.

4.2.3.6. Contagem de *Listeria monocytogenes*

A contagem de *L. monocytogenes* foi realizada segundo a Norma ISO/DIS 11290-2 de 2005. A partir da diluição inicial (10 gramas de bolo com 90 ml de uma solução de TS esterilizada) inoculou-se 0,1 ml em placas de petri contendo meio ALOA (Agar *Listeria* segundo Ottaviani & Agosti, Sharlau, Espanha) solidificado e procedeu-se ao seu espalhamento à superfície. Posteriormente incubaram-se as placas na estufa a 37°C durante 48h.

Caso tivessem surgido colónias suspeitas (azuis esverdeadas com halo opaco) estas, teriam de ser repicadas em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar, Sharlau, Espanha), que se incubaria a 37°C durante 24 horas; as colónias desenvolvidas em TSA seriam observadas ao microscópio por transiluminação de Henry e as que apresentassem luminescência azul seriam submetidas ao teste da catalase e oxidase. Posteriormente para confirmação e

identificação das colónias suspeitas utilizar-se-iam testes bioquímicos miniaturizados API-Listeria (BioMerieux, França). Os resultados foram expressos em ufc/g.

4.2.3.7. Contagem de bolores e leveduras

Segundo a metodologia descrita na Norma Portuguesa 3277-1 de 1987, procedeu-se à sementeira em placa de petri contendo meio *Rose Bengal Agar* (Scharlau, Espanha) à superfície em quintuplicado, de 0,2 ml de cada uma das diluições escolhidas.

A incubação das placas teve a duração de 5 dias a uma temperatura de estufa de 25°C, efetuando-se posteriormente a sua observação para a contagem de colónias e obtenção de resultados, resultados expressos em ufc/g.

4.2.4. Análise Sensorial

Através da percepção dos sentidos humanos, como a visão, olfacto e o paladar é possível avaliar o aspecto, o cheiro e sabor das amostras de alimentos.

Segundo a Norma ISO 6658 de 1985, existe um conjunto de determinadas regras a seguir para que os resultados obtidos através da prova sensorial sejam o mais próximo da realidade. Assim, a altura do dia em que se realizam as provas, é considerado um dos factores chave de todo o processo. Os membros pertencentes ao painel sensorial têm uma maior sensibilidade a meio da manhã e a meio da tarde, devendo-se sempre evitar realizar as provas pouco tempo antes ou depois de uma refeição. De acordo com este princípio, a meio da manhã realizou-se a prova sensorial do bolo com um dos recheios e da parte da tarde, outro.

Quanto à sala de prova para além de dever apresentar uma temperatura agradável, isenta de cheiros estranhos e sons, deve ser um local concebido com cabines individuais para cada provador realizar a prova sem ser distraído, incomodado e influenciado por outro. Neste trabalho, estes parâmetros não foram passíveis de se cumprir uma vez que o local de prova não continha as cabines individuais descritas na Norma ISO 6658 de 1985. Também não foi possível utilizar um painel treinado nem o número de provadores idealmente referenciado.

4.2.4.1. Constituição do painel de Análise Sensorial

A análise organoléptica das amostras de bolos apresentadas nos diferentes dias do estudo foi efectuada por um painel constituído por dez elementos, não treinados, recrutados dentre os trabalhadores e estudantes da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

O tipo de bolos em estudo era conhecido por todos os membros do painel, sendo que a maioria afirmava, antes da prova, que a massa de açúcar era uma parte que raramente consumiam.

4.2.4.2. Preparação e apresentação das amostras

Os bolos com recheio de doce de ovos e de mascarpone e frutos silvestres foram mantidos ao longo de cada semana de estudo, em caixas de cartão, respectivamente 6 deles à temperatura ambiente e 2 em refrigeração. No momento T0, de cada uma das três repetições efectuadas, de acordo com o delineamento experimental descrito na tabela 5, foi cortada uma fatia dos bolos A, de cada recheio respectivamente, e colocada num prato de plástico branco, individual e descartável. Os bolos foram colocados em exposição, para que os elementos do painel pudessem responder ao parâmetro “Aspecto Geral do bolo”, presente na ficha de análise (Anexo I).

No segundo momento de análise (T1) o mesmo procedimento foi seguido mas tendo em atenção que, a fim de não cansar o painel e deste modo, por em causa a veracidade das respostas, foi realizada, da parte da manhã a prova do bolo A e B do recheio de mascarpone e da parte da tarde o de doce de ovo.

Por fim, na terceira e última análise de cada uma das 3 repetições do estudo, o processo realizado foi em tudo idêntico ao descrito para o segundo momento de análise, com a diferença que neste, ainda foi avaliada uma terceira amostra de cada recheio, proveniente do bolo C.

Cada amostra para análise sensorial foi servida no momento da prova e entregue aos elementos diversos do painel juntamente com uma ficha de análise para preenchimento individual e em silêncio. Era pedido a cada provador que assinalasse com um “X” a característica que melhor caracterizava cada parâmetro avaliado.

A ficha de análise utilizada para a prova considerava os seguintes atributos: aspecto geral, cor, cheiro, sabor, textura do bolo, da massa de açúcar e do creme (Anexo I).

A selecção destes atributos teve como base outras fichas técnicas de análise sensorial existentes no laboratório de Tecnologia Alimentar da FMV. Foi diferenciada a textura das três porções do bolo (massa de açúcar, massa do bolo e recheio), uma vez que a composição de cada uma delas difere bastante a nível sensorial.

4.2.5. Análise de dados

Tendo como base o grupo de alimentos prontos a comer referenciados no artigo criado pelo INSA, em 2005, considerou-se que o bolo com recheio de doce de ovos pertencia ao grupo 1 (bolos com ingredientes totalmente cozinhados) e o com recheio de mascarpone e frutos silvestres ao grupo 2 (bolos cozinhados adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria).

A tabela 6 e 7, adaptado da tabela que representa os Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos cozinhados prontos a comer, apresenta os valores propostos pelo INSA, para os dois grupos, respectivamente, classificando-os de acordo com os níveis de qualidade microbiológica: Satisfatório, Aceitável, Não Satisfatório e Inaceitável/potencialmente perigoso.

O nível Satisfatório indica que o resultado analítico traduz uma boa qualidade microbiológica do alimento; para um nível Aceitável os resultados indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos; se os resultados indicarem que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos, este será classificado como Não satisfatório. Por fim, Inaceitável/potencialmente perigoso é um nível cujo resultado deve ser comunicado imediatamente à unidade onde foi detectado, para que sejam tomadas as medidas que permitam corrigir a situação, uma vez que indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde (INSA, 2005).

Tabela 6 – Valores Guia para Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer do grupo 1 proposto pelo INSA (2005).

Microrganismo	Qualidade Microbiológica (ufc/g)			
	Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Leveduras	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>Enterobacteraceae</i>	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	NA
Microrganismos a 30°C	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>L. monocytogenes</i>	Ausente em 25g	Presente em 25g, $<10^2$	-	$\geq 10^2$
<i>S. aureus</i>	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$

NA - Não Aplicável

Tabela 7 – Valores Guia para a Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer do grupo 2 proposto pelo INSA (2005).

Microrganismo	Qualidade Microbiológica (ufc/g)			
	Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Leveduras	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>Enterobacteraceae</i>	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	NA
Microrganismos a 30°C	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
<i>L. monocytogenes</i>	Ausente em 25g	Presente em 25g, $<10^2$	-	$\geq 10^2$
<i>S. aureus</i>	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$

NA - Não Aplicável

Assim, o resultado microbiológico obtido em cada um dos diferentes momentos de análise aos bolos estudados, foi comparado com os das tabelas acima e deste modo classificado como Satisfatório, Aceitável, Não Satisfatória e Inaceitável/potencialmente perigoso.

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de Novembro referente a critérios de segurança dos géneros alimentícios, propõe os valores legais para *L. monocytogenes* na categoria de alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o seu crescimento, antes de deixarem de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu. Os resultados microbiológicos obtidos em todos os bolos foram também comparados com a proposta do Regulamento referido, a qual é idêntica ao proposto pelo INSA e deste modo, um resultado Satisfatório foi aquele que demonstrou a ausência da bactéria em 25 gramas de amostra de produto.

A nível sensorial, os bolos foram avaliados, como anteriormente referido, por um painel de provadores constituído por alunos e colaboradores da FMV, que se voluntariaram a realizar a prova e de acordo com as suas opiniões, preencheram a ficha de análise entregue no momento da prova. Os dados recolhidos durante as três repetições constituintes do estudo, foram reunidos e trabalhados de modo a obter a média relativa a cada bolo, no respectivo momento de análise. Os resultados foram expressos em percentagens.

Quanto à interpretação dos resultados obtidos, foi dada relevância às características assinaladas por mais de 25% das opiniões, ainda que, quanto ao item “Desagradável”, a partir de 10% de votos atribuídos ao mesmo, o produto tenha sido considerado como “reprovado” no teste sensorial.

Também, em relação à textura da pasta de açúcar e da massa do bolo, quando mais de 25% dos votos fossem atribuídos ao item pastoso e seco este bolo “reprovava” no teste sensorial.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Análises Microbiológicas

Neste trabalho foram analisados microbiologicamente, seis lotes diferentes de bolos em três momentos distintos - o momento T0 correspondente ao dia de confecção, T1 a três dias após confecção e T2 a seis dias após confecção.

Como já explicado anteriormente, em cada parte do estudo, foram analisados dois lotes em simultâneo, sendo que um era constituído por 4 bolos com recheio de mascarpone e frutos silvestre e outro por 4 bolos recheados de doce de ovos.

Apresentam-se abaixo a média dos resultados microbiológicos obtidos nas três repetições do presente estudo, diferenciado para melhor visualização dos valores, o bolos com recheio das mascarpone e frutos silvestres (tabela 8) e os com doce de ovo (tabela 9).

Os resultados microbiológicos para cada uma das três repetições realizadas individualmente encontram-se no Anexo II.

Tabela 8 – Média das contagens obtidas nas três repetições (ufc/g) de leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.

Média - Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres				
Microorganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	5,0 x 10	***	***
	T1	3,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ³	***
	T2	2,7 x 10 ⁶	3,5 x 10 ³	3,2 x 10 ²
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	1,5 x 10 ²	***	***
	T1	6,3 x 10 ⁴	9,0 x 10 ³	***
	T2	2,6 x 10 ⁵	4,0 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³
Microrganismos a 30°C	T0	1,2 x 10 ²	***	***
	T1	1,0 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁴	***
	T2	1,0 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁴
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo

Através da observação da tabela 8, para o bolo A, é possível verificar que há um crescimento das contagens de leveduras, *Enterobacteriaceae* e microrganismos a 30°C ao longo do tempo, entre T0 e T2. Este aumento seria espectável uma vez que o bolo foi aberto em T0, ou seja, no dia da sua confecção e a partir desse momento ficou sujeito às condições de armazenamento à temperatura ambiente e à contaminação microbiológica por perda do revestimento protector da pasta de açúcar. Ao longo dos dias era de esperar que os microrganismos se multiplicassem rapidamente, tal como aconteceu, uma vez que o bolo depois de aberto foi mantido à temperatura ambiente. Kulp (1979), referiu que a pasta de açúcar exerce um efeito protector sobre o bolo que reveste e uma vez quebrada permite facilmente a entrada de microrganismos potencialmente patogénicos externos que até então encontravam uma espécie de “barreira” à sua entrada. Autores como Baptista & Venâncio (2003), afirmam que a degradação dos alimentos ocorre naturalmente por acção dos microrganismos que os utilizam como fonte de nutrientes, sendo que esta acção conduz à sua degradação, o que os torna impróprios para consumo.

O bolo B, em todos os momentos de análise estudados, revelou contagens microbiológicas para leveduras, *Enterobacteriaceae* e microrganismos a 30°C inferiores às do bolo A, mesmo que com uma ligeira evolução.

Este bolo B, como já foi referido anteriormente, era em tudo semelhante ao bolo A, mas foi mantido fechado até ao momento da análise ao invés do A que foi aberto no tempo T0 e assim se manteve até ao último tempo de análise de cada repetição (T2). Estes resultados sugerem então, que o bolo uma vez aberto permitiu a contaminação por microrganismos provenientes do meio exterior, pois a massa de açúcar que funcionava como uma barreira protectora tinha sido quebrada e tanto a massa do bolo como o recheio ficaram mais expostos ao meio envolvente.

Os resultados obtidos no bolo C em comparação com os do bolo B e os do bolo A em T2, mostram valores inferiores para leveduras, *Enterobacteriaceae* e microrganismos a 30°C. Destes resultados pode inferir-se o efeito das temperaturas de refrigeração no crescimento/multiplicação de microrganismos, uma vez que o bolo colocado no frio apresentou valores microbiológicos inferiores relativamente aos armazenados à temperatura ambiente. Autores como Garbutt (1997), afirmam que a refrigeração não só permite um aumento da vida útil dos alimentos, como inibe o crescimento dos microrganismos mesófilos, entre os quais, se encontram as bactérias potencialmente patogénicas e deste modo a segurança para o consumidor fica aumentada, na medida em que existe um maior controlo sobre o desenvolvimento de microrganismos.

Os resultados das contagens para *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram para todos os bolos e em todos os momentos de análise <10 ufc/g. De acordo com Gilbert *et al.* (2000), a ausência de microrganismos potencialmente patogénicos em alimentos que contêm queijo, como é o caso do bolo recheado de mascarpone, é indicativa da eficiência do

processamento térmico, do cumprimento de boas práticas de higiene e inexistência de contaminações cruzadas. No caso particular, as duas últimas condições deverão ter-se verificado.

Tabela 9 – Média das contagens obtidas nas três repetições (ufc/g) de leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.

Média - Recheio de Doce de Ovo				
Microrganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	8,3 x 10	***	***
	T1	1,4 x 10	3,1 x 10	***
	T2	1,4 10 ³	1,1 x 10 ³	1,5 x 10 ²
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	<10	***	***
	T1	<10	4,4 x 10	***
	T2	7,7 x 10 ³	1,4 x 10	<10
Microrganismos a 30°C	T0	1,0 x 10 ³	***	***
	T1	9,0 x 10 ²	1,6 x 10 ³	***
	T2	1,1 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	9,7 x 10 ²
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo

Analisando os resultados apresentados na tabela 9, para o bolo A, é possível verificar que as contagens de leveduras e de *Enterobacteriaceae* se mantiveram relativamente estáveis de T0 para T1 e só em T2 aumentaram.

O bolo B, em comparação com o A, no mesmo tempo de estudo, apresentou contagens semelhantes para leveduras e microrganismos a 30°C e um valor superior para *Enterobacteriaceae*, apenas em T1, já que em T2 este valor foi comparativamente inferior.

Seria de esperar que, tal como aconteceu no recheio de mascarpone e frutos silvestres, as contagens deste bolo fossem inferiores às do bolo A, mas considerando que cada bolo é confeccionado individualmente podem existir sempre pequenas diferenças na confecção de bolo para bolo, para além de algum problema com a técnica microbiológica ou outro.

O bolo C durante todo o estudo apresentou contagens inferiores para leveduras, *Enterobacteriaceae* e microrganismos a 30°C em relação ao bolo A e B. Mais uma vez, o frio, parece demonstrar ser fundamental no aumento da vida útil do produto, sendo assim

essencial um rigoroso controlo da temperatura, para garantir a segurança de produtos de pastelaria que contenham cremes frescos (Smith *et al.*, 2004).

Os resultados das contagens para *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram, para todos os bolos do estudo e em todos os momentos de análise <10 ufc/g. Ainda que a resistência a altas temperaturas dependa das características de cada microrganismo, *S. aureus* é dos mais resistentes e pode sobreviver a 60°C durante 15 minutos (Baptista & Venâncio, 2003). A ausência constante de *L. monocytogenes* nos bolos analisados pode ser explicada pelo facto desta bactéria ser destruída a temperaturas acima dos 50°C (Ryser & Marth, 2007), temperatura, ultrapassada durante a confecção dos bolos, com excepção do recheio de mascarpone e frutos silvestres, o qual, não sofre processamento térmico. Neste recheio cru, a principal fonte de preocupação é a presença potencial de *L. monocytogenes* no queijo mascarpone, mas sendo este elaborado a partir de leite de vaca pasteurizado e partindo do pressuposto que a pasteurização foi realizada de forma correcta, a probabilidade desta bactéria estar presente torna-se reduzida (Rocourt & Cossart, 1997).

Analisando em paralelo as tabelas 8 e 9 é possível perceber, que de um modo geral, a contagem para leveduras, *Enterobacteriaceae* e microrganismos a 30°C do bolo com recheio de mascarpone é superior à do bolo com doce de ovos, o que se poderá reflectir na determinação da vida útil de cada um.

Estes resultados são facilmente entendidos tendo em conta o processo de fabrico de cada recheio. O recheio de mascarpone, apresenta queijo, que pelas suas características, permite um fácil desenvolvimento microbiano, com frutos silvestres que são colocados no bolo ainda congelados. A água proveniente do descongelamento destes frutos é absorvida pela massa de chocolate, o que irá, inevitavelmente tornar este bolo mais húmido, facilitando o crescimento e proliferação de diversos microrganismos. Este recheio, não sofre assim nenhum processamento térmico, sendo por isso constituído por ingredientes crus e deste modo, autores como Baptista & Venâncio (2003), afirmam que o armazenamento ou a manipulação inadequada destes ingredientes contribuem para um aumento importante de microrganismos ao longo do processo de fabrico, aumentando o risco de se obter um alimento perigoso caso ocorra alguma falha.

Ao invés, o recheio de doce de ovo, é sujeito a fervura e para aumentar a sua segurança, ainda são utilizados ovos pasteurizados em detrimento de ovos frescos. Autores como Smith *et al.* (2004), referem a utilização de ovos pasteurizados como um factor essencial para controlar a presença de microrganismos patogénicos, entre os quais se destaca *Salmonella* spp., em recheios não cozinhados ou ligeiramente cozinhados.

4.3.2. Classificação de resultados segundo os Valores Guia propostos pelo INSA

Na tabela 10 mostra-se a classificação do bolo A com recheio de mascarpone e frutos silvestres de acordo com a proposta do INSA (2005).

Tabela 10 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), nos diferentes tempos de estudo para o bolo A com recheio de mascarpone e frutos silvestres.

Bolo A – Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres			
	Microrganismo	Resultados das médias das contagens (ufc/g)	Classificação segundo INSA (2005)
T0	Leveduras	5,0 x 10	Satisfatório
	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,5 x 10 ²	Aceitável
	Microrganismos a 30°C	1,2 x 10 ²	Satisfatório
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório
T1	Leveduras	3,0 x 10 ⁴	Aceitável
	<i>Enterobacteriaceae</i>	6,3 x 10 ⁴	Não Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	1,0 x 10 ⁵	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório
T2	Leveduras	2,7 x 10 ⁶	Não Satisfatório
	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,6 x 10 ⁵	Não Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	1,0 x 10 ⁶	Não Satisfatório
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório

Através da observação da tabela 10, é possível verificar que para as contagens de *Enterobacteriaceae* no momento T1 o resultado é classificado como Não satisfatório, assim como para leveduras, *Enterobacteriaceae* e microrganismos a 30°C no momento T2.

Estas classificações indicam que o bolo, no terceiro dia após abertura, não deverá provavelmente ser consumido.

Na tabela 11 mostra-se a classificação do bolo B com recheio de mascarpone e frutos silvestres de acordo com a proposta do INSA (2005).

Tabela 11 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005) para o bolo B com recheio de mascarpone e frutos silvestres.

Bolo B – Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres			
	Microrganismo	Resultados das médias das contagens (ufc/g)	Classificação segundo INSA (2005)
T1	Leveduras	$1,0 \times 10^3$	Aceitável
	<i>Enterobacteriaceae</i>	$9,0 \times 10^3$	Aceitável
	Microrganismos a 30°C	$1,8 \times 10^4$	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório
T2	Leveduras	$3,5 \times 10^3$	Aceitável
	<i>Enterobacteriaceae</i>	$4,0 \times 10^4$	Não satisfatório
	Microrganismos a 30°C	$1,2 \times 10^5$	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório

Pela observação da tabela 11, é possível constatar que ao invés do bolo A em T1, o B no mesmo momento não obteve nenhuma classificação Não satisfatória.

No entanto em T2, a contagem para *Enterobacteriaceae* foi classificada como Não satisfatória e por este motivo, nesse momento, o bolo já não deverá ser consumido.

Na tabela 12 mostra-se a classificação do bolo C com recheio de mascarpone e frutos silvestres de acordo com a proposta do INSA (2005).

Tabela 12 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), no bolo C com recheio de mascarpone e frutos silvestres.

Bolo C – Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres			
	Microrganismo	Resultados das médias das contagens (ufc/g)	Classificação segundo INSA (2005)
T2	Leveduras	$3,2 \times 10^2$	Satisfatório
	<i>Enterobacteriaceae</i>	$5,0 \times 10^3$	Aceitável
	Microrganismos a 30°C	$4,6 \times 10^4$	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório

O bolo C revelou resultados favoráveis (tabela 12), pois não obteve nenhuma classificação Não satisfatória como se verificou para o bolo B e A no mesmo momento. Estes resultados realçaram, mais uma vez, o efeito das temperaturas de refrigeração no prolongar da vida útil de um produto.

Na tabela 13 mostra-se a classificação do bolo A com recheio de doce de ovo de acordo com a proposta do INSA (2005).

Tabela 13 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), nos diferentes tempos de estudo para o bolo A com recheio doce de ovo.

Bolo A – Recheio de Doce de Ovo			
	Microrganismo	Resultados das médias das contagens (ufc/g)	Classificação segundo INSA (2005)
T0	Leveduras	8,3 x 10	Satisfatório
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<10	Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	1,0 x 10 ³	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório
T1	Leveduras	1,4 x 10	Aceitável
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<10	Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	9,0 x 10 ²	Satisfatório
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório
T2	Leveduras	1,4 x 10 ³	Aceitável
	<i>Enterobacteriaceae</i>	7,7 x 10 ³	Não Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	1,1 x 10 ⁴	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório

Através da tabela 13 identificou-se apenas um resultado Não satisfatório para *Enterobacteriaceae* no momento T2. Estes resultados reforçaram o facto deste bolo ser constituído por ingredientes totalmente cozinhados e como tal, mesmo aberto e mantido à temperatura ambiente, só seis dias após confecção e abertura é que apresentou um resultado Não satisfatório. Não obstante, é de realçar, que neste tempo não deverá talvez ser consumido. De facto, Gámbaro *et al.* (2005), demonstraram que a utilização de ingredientes de alta qualidade na formulação dos produtos, assim como o cumprimento escrupuloso dos procedimentos de confecção, respeitando o binómio tempo-temperatura, permitem diminuir a carga microbiológica inicial presente num determinado alimento e seu subsequente desenvolvimento, tal como se verificou neste bolo.

Na tabela 14 mostra-se a classificação do bolo B com recheio de doce de ovo de acordo com a proposta do INSA (2005).

Tabela 14 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), para o bolo B com recheio de doce de ovo.

Bolo B - Recheio de Doce de Ovo			
	Microrganismo	Resultados das médias das contagens (ufc/g)	Classificação segundo INSA (2005)
T1	Leveduras	3,1 x 10	Satisfatório
	<i>Enterobacteriaceae</i>	4,4 x 10	Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	1,6 x 10 ³	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório
T2	Leveduras	1,1 x 10 ³	Aceitável
	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,4 x 10	Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	1,5 x 10 ⁴	Aceitável
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório

O bolo B, tanto em T1 como em T2 demonstrou resultados favoráveis (tabela 14) uma vez que nenhum resultado microbiológico foi classificado como Não satisfatório.

Na tabela 15 mostra-se a classificação do bolo C com recheio de doce de ovo de acordo com a proposta do INSA (2005).

Tabela 15 – Média das contagens (ufc/g) para leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e sua classificação seguindo os valores guia propostos pelo INSA (2005), para o bolo C com recheio de doce de ovo.

Bolo C - Recheio de Doce de Ovo			
	Microrganismo	Resultados das médias das contagens (ufc/g)	Classificação segundo INSA (2005)
T2	Leveduras	1,5 x 10 ²	Satisfatório
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<10	Satisfatório
	Microrganismos a 30°C	9,7 x 10 ²	Satisfatório
	<i>L. monocytogenes</i>	<10	Satisfatório
	<i>S. aureus</i>	<10	Satisfatório

Através da classificação segundo os Valores Guia presentes, todos os resultados microbiológicos para o bolo C revelaram ser Satisfatórios, o que se pode constatar pela observação da tabela 15. De novo, os efeitos da refrigeração no prolongamento da vida útil do produto foram evidenciados pelos resultados obtidos nos bolos sujeitos a este processo de conservação.

4.3.3. Resultados da Análise Sensorial

A análise sensorial surgiu, neste trabalho, na tentativa de se perceber quais as alterações perceptíveis a nível organoléptico, que os bolos estudados apresentavam de acordo com o tipo de armazenamento a que foram sujeitos durante todo o estudo

Como já referido anteriormente, este painel era constituído por 10 pessoas, recrutadas de entre os trabalhadores e alunos da FMV e ao contrário do que seria desejável, para além de um número maior de provadores, este painel não estava treinado.

Sendo a análise sensorial um teste algo subjectivo e de difícil interpretação, mais complicações surgem, quando os membros do painel não estão treinados. Foi possível perceber pelos comentários de algumas pessoas que aquele tipo de bolos não correspondia às suas preferências, particularmente a pasta de açúcar que os revestia.

O recheio de mascarpone e frutos silvestres também não era, de todo, apreciado pela maioria do painel. Estes factores limitativos, condicionaram muito possivelmente as respostas obtidas.

A tabela 16 mostra os resultados obtidos no inquérito de avaliação sensorial apresentado para o Bolo A com Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres.

Tabela 16 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo A com recheio de Mascarpone e frutos Silvestres.

	Média Bolo A – Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres			
	Parâmetros	T0	T1	T2
Aspecto Geral do Bolo	Desagradável	0%	0%	3%
	Aceitável	7%	20%	23%
	Agradável/Característico	50%	43%	57%
	Muito Agradável	43%	33%	17%
Cheiro do Bolo	Desagradável	0%	7%	43%
	Aceitável	37%	50%	37%
	Agradável/Característico	60%	37%	20%
	Muito Agradável	3%	10%	0%
Sabor do Bolo	Desagradável	3%	13%	60%
	Aceitável	30%	43%	30%
	Agradável/Característico	57%	37%	3%
	Muito Agradável	10%	7%	7%

Tabela 16 (continuação) – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo A com recheio de Mascarpone e frutos Silvestres.

	Média Bolo A – Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres			
	Parâmetros	T0	T1	T2
Textura do Bolo	Fofo	43%	7%	10%
	Húmido	57%	80%	80%
	Duro	0%	7%	7%
	Seco	0%	7%	3%
Textura da Massa de Açúcar	Mole	17%	3%	13%
	Farinhenta	20%	10%	23%
	Granulosa	20%	13%	17%
	Dura	23%	50%	30%
	Pastosa	20%	23%	17%
Textura do Creme	Não Cremoso	3%	7%	27%
	Pouco Cremoso	13%	23%	27%
	Cremoso	57%	53%	33%
	Muito Cremoso	30%	10%	13%
	Extremamente Cremoso	0%	0%	0%

Em relação ao Bolo A, no momento T0:

- O parâmetro Aspecto Geral foi classificado maioritariamente como Agradável/Característico e Muito Agradável.
- Quanto ao Cheiro e Sabor do Bolo, Agradável/Característico e Aceitável foram os itens mais seleccionados pelo painel.
- No que diz respeito à Textura do Bolo, as características Húmido e Fofo foram as mais atribuídas.
- Na Textura da Massa de Açúcar as respostas obtidas demonstraram o quão este parâmetro é subjectivo, pois comentários como “nunca como esta parte” foram pronunciados por alguns membros do painel. Deste modo, as opiniões foram divididas por todas os itens enumerados na ficha de análise, apresentando a textura Dura uma percentagem ligeiramente superior às restantes.
- Em relação à Textura do Creme, o maior número de votos incidiu na opção Cremoso e Muito Cremoso.

Para o momento T1:

- Tal como em T0, o parâmetro Aspecto Geral concentrou as suas opiniões em Agradável/Característico e Muito Agradável, ainda que esta última classificação tenha sofrido um decréscimo de 10% em relação ao momento T0.
- Quanto ao Cheiro e Sabor do Bolo, as classificações com o maior número de votos foram Aceitável e Agradável/Característica, ainda que Aceitável tenha obtido uma percentagem superior em ambos os parâmetros, ao invés do que se verificou para o momento T0.
- De realçar, ainda, que 13% dos votos foram atribuídos ao item Desagradável quanto ao Sabor do Bolo.
- A nível da Textura do Bolo 80% do painel classificou-o como Húmido.
- No parâmetro Textura da Massa de Açúcar, a opinião seleccionada pela maioria do painel foi a Dura.
- Quanto à Textura do Creme a maioria, novamente, avaliou-o como Cremoso.

Em relação ao momento T2:

- Para o Aspecto Geral, Agradável/Característico foi o parâmetro mais votado reunindo 57% das opiniões.
- Quanto ao Cheiro o item mais assinalado foi Desagradável com 43% dos votos, ainda que 37% do painel tivesse achado Aceitável.
- Em relação ao Sabor do Bolo, Desagradável, obteve 60% das opiniões e comentários tais como “cheira e sabe a azedo” foram expressos por alguns membros do painel.
- A Textura do Bolo tal como em T1 foi considerada Húmida, com 80% dos votos.
- Quanto à Textura do Creme, ainda que 33% do painel tivesse achado Cremoso, foram também mencionados os itens Não Cremoso e Pouco Cremoso, obtendo a mesma percentagem de votos, ambos com 27%.

Comparados os três tempos de análise para o Bolo A, com recheio de mascarpone e frutos silvestres armazenado à temperatura ambiente, observa-se que sensorialmente este obteve classificação Desagradável em relação ao Sabor, a partir do terceiro dia da data da sua confecção e abertura. Ainda que tenha sido assim classificado por 13% do painel no momento T1 esta percentagem merece valorização uma vez que no momento seguinte, em T2, esta classificação sobe para 60%.

De realçar ainda que em T2, o Cheiro é considerado também Desagradável por 47% das opiniões.

Perante estes resultados, presume-se que a partir do terceiro dia após confecção e abertura do bolo mantido à temperatura ambiente, este já não foi aceite pelos membros do painel, tendo sido deste modo “reprovado” na prova sensorial realizada em T1 e T2.

A tabela 17 mostra os resultados obtidos no inquérito de avaliação sensorial apresentado para o Bolo B com recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres.

Tabela 17 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo B com recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres.

	Média Bolo B – Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres		
	Parâmetros	T1	T2
Aspecto Geral do Bolo	Desagradável	0%	0%
	Aceitável	23%	40%
	Agradável/Característico	40%	47%
	Muito Agradável	37%	13%
Cheiro do Bolo	Desagradável	0%	17%
	Aceitável	40%	30%
	Agradável/Característico	53%	50%
	Muito Agradável	7%	3%
Sabor do Bolo	Desagradável	8%	27%
	Aceitável	43%	40%
	Agradável/Característico	43%	30%
	Muito Agradável	5%	0%
Textura do Bolo	Fofo	23%	10%
	Húmido	60%	77%
	Duro	0%	0%
	Seco	17%	13%
Textura da Massa de Açúcar	Mole	10%	30%
	Farinhenta	7%	23%
	Granulosa	13%	13%
	Dura	43%	13%
	Pastosa	27%	20%
Textura do Creme	Não Cremoso	3%	23%
	Pouco Cremoso	20%	27%
	Cremoso	73%	40%
	Muito Cremoso	3%	10%
	Extremamente Cremoso	0%	0%

Para o Bolo B no momento T1:

- Agradável/Característica e Muito Agradável foram as opiniões mais seleccionadas quanto ao Aspecto Geral obtendo respectivamente 40% e 37% dos votos.
- Em relação ao Cheiro, o item Agradável/Característico obteve 53% dos votos, seguido de Aceitável, com 40%.
- Quanto ao Sabor do Bolo, 43% dos votos incidiram de forma equitativa tanto no item Aceitável como no Agradável/Característico.

- No que se refere à Textura do Bolo, a maioria dos votos foram atribuídos ao item Húmido.
- A Textura da Massa de Açúcar foi considerada dura e pastosa por 43% e 27% dos votos, respectivamente.
- Quanto à Textura do Creme a classificação Cremoso obteve 73% dos votos.

Comparando o Bolo B com o A, ambos no momento T1, deduz-se que a nível sensorial existiram diferenças perceptíveis que foram demonstradas essencialmente através do parâmetro Cheiro, que no caso do Bolo B não obteve nenhuma classificação Desagradável ao invés do Bolo A com 7% dos votos.

Em relação ao Sabor, também o Bolo A apresentou um valor ligeiramente superior em relação ao B, no item Desagradável, com 13% e 8% dos votos, respectivamente.

De referir ainda, que o Bolo B no momento T1 foi rejeitado sensorialmente, uma vez que 27% do painel considerou a pasta de açúcar pastosa.

Para o Bolo B em T2:

- Quanto ao Aspecto Geral, os itens Agradável/Característico e Aceitável obtiveram os maiores votos.
- Em relação ao Cheiro, 17% achou Desagradável ainda que 50% e 30% dos votos tenham sido atribuídos, respectivamente ao item Agradável/Característico e Aceitável.
- Quanto ao Sabor, há que referir que 27% do painel achou Desagradável em oposição a outros dois parâmetros mais votados, como 40% e 30% dos votos, respectivamente, Aceitável e Agradável/Característico.
- Em relação à Textura do Bolo, tal como em T1, mais de maioria do painel, considerou Húmido.
- No que diz respeito à Textura da Massa de Açúcar, os itens Mole e Farinhenta foram os mais votados.
- Quanto à Textura do Creme, Cremoso e Pouco Cremoso foram as características destacadas, sendo que a textura Cremosa obteve a classificação mais elevada com 40% dos votos.

Comparando o Bolo B em T2 com o Bolo A no mesmo tempo, facilmente se presume que ambos foram conotados como sensorialmente Desagradáveis quanto ao Cheiro e ao Sabor. Importa referir no entanto, que o Bolo A, obteve 43% dos votos no item Desagradável em relação ao Cheiro, enquanto o Bolo B apresentou um valor de 17%. Também em relação ao Sabor, o mesmo item foi classificado com 60% dos votos para o Bolo A e com 27% para o Bolo B.

Esta diferença poderá ser explicada pelo facto do Bolo A, uma vez aberto, ter sofrido uma rápida fermentação dos constituintes do seu recheio o que lhe deu o sabor e cheiro a “azedo” mais intensos do que no caso do Bolo B que se manteve fechado até ao momento da prova. De facto, Anderson & Pascual (2000), demonstraram que a fermentação por parte das bactérias e leveduras, existentes num determinado alimento, ocorre mais facilmente a partir do momento em que o mesmo sofre alteração da sua integridade, nomeadamente, quando mantido à temperatura ambiente.

A tabela 18 mostra os resultados obtidos no inquérito de avaliação sensorial apresentado para o Bolo C com recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres

Tabela 18 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo C com recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres.

	Média Bolo C – Recheio de Mascarpone e Frutos e Silvestres	
	Parâmetros	T2
Aspecto Geral do Bolo	Desagradável	7%
	Aceitável	27%
	Agradável/Característico	47%
	Muito Agradável	20%
Cheiro do Bolo	Desagradável	7%
	Aceitável	47%
	Agradável/Característico	43%
	Muito Agradável	3%
Sabor do Bolo	Desagradável	7%
	Aceitável	50%
	Agradável/Característico	33%
	Muito Agradável	10%
Textura do Bolo	Fofo	23%
	Húmido	50%
	Duro	7%
	Seco	20%
Textura da Massa de Açúcar	Mole	3%
	Farinhenta	23%
	Granulosa	13%
	Dura	23%
	Pastosa	50%
Textura do Creme	Não Cremoso	10%
	Pouco Cremoso	27%
	Cremoso	43%
	Muito Cremoso	17%
	Extremamente Cremoso	3%

Em relação ao Bolo C no momento T2:

- Quanto ao Aspecto Geral, foi considerado como Agradável/Característico por 47% do painel e como Aceitável por 27%.
- Em relação ao Cheiro, as características que se destacaram foram a Aceitável e Agradável/Característica.
- Quanto ao Sabor, 50% dos votos foram atribuídos pelo painel ao item Aceitável.
- No que diz respeito à Textura do Bolo, Húmido e Fofo foram os itens mais atribuídos, ainda que Húmido, tenha obtido a opinião da maioria dos votos.
- Quanto à Textura da Massa de Açúcar, verificou-se que 50% do painel a classificou como Pastosa, o que poderá ter estado relacionado com o facto deste bolo ter sido sujeito a refrigeração durante 6 dias, ao invés do bolo A e B armazenados à temperatura ambiente. A camara frigorífica apresenta uma maior concentração de humidade do que o meio ambiente e esta possivelmente terá sido absorvida pela massa de açúcar, tornando-a pastosa ao paladar.
- Em relação à Textura do Creme, Cremoso foi o item destacado com 43% dos votos.

Comparando o Bolo C com o B em T2 é possível verificar, ainda que por motivos diferentes, que ambos não foram sensorialmente aceites. O Bolo B pelos motivos anteriormente verificados e o Bolo C essencialmente devido à alteração da Textura da Massa de Açúcar que em refrigeração se tornou Pastosa, sendo esta característica desagradável ao paladar.

A tabela 19 mostra os resultados obtidos no inquérito de avaliação sensorial apresentado para o Bolo A com recheio de Doce de Ovo.

Tabela 19 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo A com recheio de Doce de Ovo.

	Média Bolo A – Recheio de Doce de Ovo			
	Parâmetros	T0	T1	T2
Aspecto Geral do Bolo	Desagradável	0%	0%	0%
	Aceitável	3%	30%	27%
	Agradável/Característico	37%	43%	57%
	Muito Agradável	60%	27%	17%
Cheiro do Bolo	Desagradável	0%	3%	0%
	Aceitável	23%	30%	53%
	Agradável/Característico	60%	53%	40%
	Muito Agradável	17%	13%	7%
Sabor do Bolo	Desagradável	0%	0%	9%
	Aceitável	33%	50%	63%
	Agradável/Característico	57%	50%	30%
	Muito Agradável	10%	0%	10%
Textura do Bolo	Fofo	43%	13%	17%
	Húmido	43%	33%	10%
	Duro	0%	10%	13%
	Seco	13%	50%	60%
Textura da Massa de Açúcar	Mole	10%	7%	0%
	Farinhenta	20%	23%	17%
	Granulosa	17%	20%	17%
	Dura	27%	30%	43%
	Pastosa	23%	20%	23%
Textura do Creme	Não Cremoso	3%	0%	0%
	Pouco Cremoso	0%	13%	33%
	Cremoso	60%	83%	63%
	Muito Cremoso	37%	3%	3%
	Extremamente Cremoso	0%	0%	0%

Para o Bolo A no momento T0:

- O Aspecto Geral foi considerado por mais de maioria do painel como Muito Agradável, com 60% dos votos, seguido de Agradável/Característico com um valor de 37%.
- Quanto ao Cheiro e Sabor, o item atribuído por mais de maioria do painel foi Agradável/Característico com valores de 60% e 57%, respectivamente.
- Em relação à Textura do Bolo, as opiniões dividiram-se igualmente entre Fofo e Húmido, ambos com 43%.
- Para a Textura da Massa de Açúcar, as opiniões variaram bastante, não havendo nenhuma resposta concisa, embora o item Dura tenha tido uma classificação ligeiramente superior aos restantes.

- Quanto à Textura do Creme, a classificação mais destacada foi a Cremosa com 60% dos votos, seguida de Muito Cremoso com 37%.

No momento T1:

- Para o Aspecto Geral, as duas características mais assinaladas, foram a Agradável/Característica e Aceitável, com 43% e 30%, respectivamente dos votos.
- Quanto ao Cheiro, também Aceitável e Agradável/Característico, foram os itens mais votados, ainda que, este último, tenha obtido a maioria das percentagens, com uma classificação de 53%.
- Para o Sabor, metade dos provadores acharam o bolo Aceitável e outra metade Agradável/Característico.
- Em relação à Textura do Bolo, o item mais assinalado foi o Seco, com 50% dos votos, ainda que 33% das opiniões tivessem incidido sobre o item Húmido.
- A Textura da Massa de Açúcar foi considerada Dura, por 30% dos votos, ainda que as opiniões se tenham dispersado, um pouco, por todos os itens apresentados.
- Em relação à Textura do Creme, a opinião foi unânime, arrecadando o item Cremoso 83% dos votos.

No momento T2:

- O Aspecto Geral foi classificado maioritariamente como Agradável/Característico, com 57% das opiniões.
- Quanto ao Sabor e ao Cheiro, Aceitável foi a característica atribuída por mais de maioria do painel com 63% e 53% dos votos, respectivamente. No parâmetro, Cheiro do Bolo, o item Desagradável não foi mencionado, enquanto que para o Sabor, 9% dos votos caíram sobre este item. Estes resultados podem ser facilmente comparados com os do Bolo A com recheio de mascarpone e frutos silvestres, cuja classificação em T2, quanto ao Cheiro e Sabor obtiveram 43% e 60% de votos no item Desagradável.
- Tal como em T1, a Textura do Bolo mais seleccionada foi a Seca, obtendo um valor de 47% das votações.
- A Textura da Massa de Açúcar, foi considerada Dura por 43% das opiniões.
- Quanto à Textura do Creme, Cremoso foi a característica destacada por 63% dos votos, ainda que 33% dos mesmos, tivessem sido atribuídos a Pouco Cremoso.

Comparando os três tempos de análise para o Bolo A com recheio de doce de ovo, pode-se inferir que apesar de este não ter sido conotado como Desagradável quanto ao Cheiro e Sabor, da mesma forma que se verificou no bolo semelhante, mas com recheio de mascarpone e frutos silvestres, identifica-se como principal limitação de aceitação sensorial, o facto de, a partir do terceiro dia após abertura, ter sido atribuída à sua textura, a

característica Seca, pela maioria do painel. Esta textura poderá, estar em parte, relacionada com o processo de endurecimento, já anteriormente explicado, característico dos produtos de pastelaria, uma vez que os autores Sych *et al.* (1987) e Gómez *et al.* (2008), referem o endurecimento, como um processo complexo, que envolve diversas alterações sensoriais nos produtos, diminuindo assim, a sua aceitação, por parte do consumidor.

A tabela 20 mostra os resultados obtidos no inquérito de avaliação sensorial apresentado para o Bolo B com recheio de Doce de Ovo.

Tabela 20 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo B com recheio de Doce de Ovo.

	Média Bolo B – Recheio de Doce de Ovo		
	Parâmetros	T1	T2
Aspecto Geral do Bolo	Desagradável	0%	0%
	Aceitável	27%	27%
	Agradável/Característico	40%	53%
	Muito Agradável	33%	20%
Cheiro do Bolo	Desagradável	0%	0%
	Aceitável	37%	60%
	Agradável/Característico	57%	40%
	Muito Agradável	7%	0%
Sabor do Bolo	Desagradável	0%	3%
	Aceitável	43%	64%
	Agradável/Característico	53%	20%
	Muito Agradável	3%	13%
Textura do Bolo	Fofo	17%	10%
	Húmido	27%	10%
	Duro	17%	3%
	Seco	40%	77%
Textura da Massa de Açúcar	Mole	13%	10%
	Farinhenta	17%	27%
	Granulosa	17%	20%
	Dura	23%	30%
	Pastosa	30%	13%
Textura do Creme	Não Cremoso	0%	0%
	Pouco Cremoso	10%	23%
	Cremoso	77%	67%
	Muito Cremoso	13%	7%
	Extremamente Cremoso	0%	3%

Para o Bolo B no momento T1:

- No Aspecto Geral, os dois itens destacados foram Agradável/Característico com 40% dos votos, seguido de Muito Agradável, com um valor de 33%.
- Quanto ao Cheiro, 57% das opiniões foram conotadas como Agradável/Característico, seguido de Aceitável com 37% dos votos, sendo que o mesmo se verificou para o Sabor, ainda que, com valores de 53% e 43%, respectivamente.
- Quanto à Textura do Bolo, tal como se verificou para o Bolo A, no mesmo momento o item mais assinalado foi o Seco, neste caso, com 40% dos votos, ainda que 27% das opiniões tivessem caído sobre o item Húmido.
- No que diz respeito à Textura da Massa de Açúcar, Pastosa e Dura, foram as características mais assinaladas com 30% e 23% dos votos respectivamente.
- Em relação à Textura do Creme, tal como se verificou para o Bolo A, no mesmo momento a opinião foi unanime, reunindo o item Cremoso, neste caso, 77% das opiniões.

Comparando o Bolo B com Bolo A, no momento T1, observa-se que a nível organoléptico apenas a textura da massa de açúcar diferiu entre as classificações atribuídas, verificando-se que no caso do Bolo B 30% do painel a considerou pastosa, motivo este de rejeição sensorial. Também neste momento, ambos os Bolos foram rejeitados devido à sua Textura que foi considerada Seca

Analisando os resultados obtidos, em T2, para Bolo A e B, facilmente se percebe que as respostas obtidas em ambos foram sensivelmente as mesmas, destacando-se apenas uma pequena exceção relativamente ao Sabor, que no caso do Bolo A, obteve 9% de classificação Desagradável, enquanto que para o Bolo B esta percentagem foi apenas de 3%.

Deste modo é possível inferir que a nível sensorial, o bolo aberto no dia de confecção, com recheio de doce de ovo diferiu, ainda que ligeiramente, do fechado com a mesma idade de fabrico, ambos armazenados à temperatura ambiente.

A tabela 21 mostra os resultados obtidos no inquérito de avaliação sensorial apresentado para o Bolo C com recheio de Doce de Ovo.

Tabela 21 – Média de respostas atribuídas em percentagem a cada item dos parâmetros sensoriais analisados, para o Bolo C com recheio de Doce de Ovo.

	Média Bolo C – Recheio de Doce de Ovo	
	Parâmetros	T2
Aspecto Geral do Bolo	Desagradável	0%
	Aceitável	27%
	Agradável/Característico	57%
	Muito Agradável	17%
Cheiro do Bolo	Desagradável	0%
	Aceitável	43%
	Agradável/Característico	53%
	Muito Agradável	3%
Sabor do Bolo	Desagradável	7%
	Aceitável	53%
	Agradável/Característico	37%
	Muito Agradável	3%
Textura do Bolo	Fofo	17%
	Húmido	13%
	Duro	10%
	Seco	60%
Textura da Massa de Açúcar	Mole	20%
	Farinhenta	23%
	Granulosa	13%
	Dura	23%
	Pastosa	53%
Textura do Creme	Não Cremoso	7%
	Pouco Cremoso	17%
	Cremoso	67%
	Muito Cremoso	7%
	Extremamente Cremoso	3%

Relativamente ao Bolo C e ao Bolo B, para o momento T2, as mesmas características destacadas em cada parâmetro estudado foram atribuídas a ambos, com exceção da Textura da Massa de Açúcar. Tal como se verificou no Bolo C, com o recheio de mascarpone e frutos silvestres, também neste caso, a Massa de Açúcar foi classificada pela maioria do painel como Pastosa.

Ainda que a nível microbiológico o resultado para ambos os bolos refrigerados tenha sido satisfatório, sensorialmente os mesmos foram rejeitados. Hough *et al.* (2003), afirmam que

de facto, alguns alimentos podem ser microbiologicamente seguros depois de um determinado tempo de armazenamento mas serem rejeitados pelos consumidores devido às alterações nas suas propriedades sensoriais, tal como se verificou neste trabalho.

5. Conclusão

Numa sociedade evoluída e cada vez mais exigente como aquela em que vivemos, o conceito de qualidade e segurança alimentar tem sofrido uma evolução constante. Para que as empresas garantam o seu sucesso é fundamental considerarem os estudos de vida útil dos seus alimentos como parte integrante da segurança alimentar e neste sentido devem promover o seu estudo.

Após a realização deste trabalho constatou-se que para ambos os bolos recheados, o ideal do ponto de vista da segurança microbiológica do produto, será a sua colocação em refrigeração após fabrico. No entanto a maioria das pessoas não possui frigoríficos com espaço suficiente para colocar estes bolos de grandes dimensões, para além de que a massa de açúcar nestas condições se torna pastosa, alteração esta que demonstrou ser o factor limitativo do tempo de vida útil dos bolos refrigerados.

Seria de esperar, tal como se verificou para ambos os recheios, que o tempo de vida útil do bolo aberto no dia de confecção, fosse inferior ao do bolo não partido, mantidos sob as mesmas condições de armazenamento, uma vez que a pasta de açúcar para além do seu efeito decorativo, desempenha nestes bolos uma função protectora, impedindo que as perdas de humidade e as contaminações microbiológicas provenientes do meio externo, ocorram de forma fácil e rápida.

Era também espectável a nível microbiológico, que o tempo de vida útil do bolo com recheio de mascarpone e frutos silvestres fosse inferior ao do doce de ovo, uma vez que o primeiro, é um recheio cru ao invés do doce de ovo totalmente cozinhado e elaborado com ovos pasteurizados. Tal facto confirmou-se neste estudo.

Assim, através dos resultados obtidos durante este trabalho, propõe-se que o prazo de vida útil para o bolo com recheio de mascarpone e frutos silvestres seja o seguinte:

- Se aberto no próprio dia de confecção e armazenado à temperatura ambiente, deverá ser consumido no mesmo dia de abertura, tendo em conta que três dias após abertura, obteve a nível microbiológico classificação Não Satisfatória e a nível sensorial foi classificado como Desagradável quanto ao Sabor.

Sugere-se que em estudos futuros este bolo seja analisado também no primeiro e segundo dia após a abertura, na tentativa de se estabelecer com maior precisão o tempo de vida útil do mesmo.

- Se mantido fechado e armazenado à temperatura ambiente, deverá ser consumido no mesmo dia do seu fabrico, uma vez que no momento T1 este Bolo sensorialmente já não foi aceite devido à textura da pasta de açúcar ter sido considerada pastosa por 27% do painel.
- Se colocado em refrigeração e mantido fechado, a nível microbiológico este bolo demonstrou estar apto para consumo até seis dias após a data de confecção, no

entanto, sensorialmente, 50% do painel atribuiu à massa de açúcar que o reveste, a textura Pastosa, sendo esta característica conotada negativamente e por isso este bolo foi “reprovado” no teste.

Sugere-se assim que em estudos futuros o bolo refrigerado seja submetido a mais momentos de análise e não apenas a um, como o que sucedeu no presente trabalho, pois seria importante perceber a partir de que momento é que a textura da massa de açúcar sofre tal alteração organoléptica.

Em relação ao bolo com recheio de doce de ovo o prazo de vida útil proposto será:

- Se aberto no próprio dia de confecção e armazenado à temperatura ambiente, deverá ser consumido no mesmo dia. Ainda que este bolo tenha obtido resultados microbiológicos satisfatórios até ao momento de análise T1 inclusive, neste tempo já foi considerado Seco por 50% do painel, sendo esta característica sensorial o factor limitativo do tempo de vida útil deste bolo.

Propõe-se que em estudos futuros se aumente os momentos de análise, para o primeiro e segundo dia após abertura do bolo, na tentativa de se estabelecer um tempo de vida útil com maior precisão.

- Se mantido fechado e armazenado à temperatura ambiente deverá ser consumido no mesmo dia da sua confecção, uma vez que no momento T1 este bolo sensorialmente já não foi aceite. Constatou-se, deste modo, que a nível microbiológico o bolo B obteve resultados satisfatórios nos dois momentos de análise a que foi sujeito, sendo o principal factor limitativo do seu tempo de vida útil a característica Seca atribuída à textura do bolo no momento T1 por 40% do painel, valor este que subiu para 77% em T2.

Sugere-se que em estudos futuros, este bolo seja analisado sensorialmente no primeiro e segundo dia após confecção, para se perceber com maior exactidão a partir de que momento é que a sua textura se torna Seca, motivo este de rejeição sensorial.

- Se colocado em refrigeração e mantido fechado, a nível microbiológico este bolo demonstrou estar apto para consumo até seis dias após a data de confecção, no entanto, sensorialmente, 53% do painel atribuiu à massa de açúcar que o reveste, a textura Pastosa, sendo esta característica conotada negativamente e por isso este bolo foi “reprovado”.

Sugere-se assim que em trabalhos futuros o bolo refrigerado seja submetido a mais momentos de análise e não apenas a um, tal como descrito anteriormente para o bolo com recheio de mascarpone e frutos silvestres.

Propõe-se também que a análise sensorial seja realizada por um painel treinado, reunindo um número superior de provadores. A estrutura da ficha de análise utilizada para a prova, deverá ser alterada para a elaboração de um teste hedónico, cujos resultados devidamente interpretados, poderão ser mais conclusivos do que os obtidos.

6. Bibliografia

Adams, M.R. & Moss, M.O. (2000). *Food Microbiology*. (2^a ed.). University of Surrey, Guildford, UK: The Royal Society of Chemistry.

Ahmed, R., Soule, G., Demczuk, W.H., Clark, C., Khakhria, R., Ratnam, S., Marshall, S., Ng, L.K., Woodward, D.L. & Johnson, W.M. (2000). Epidemiological typing of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2403-2406.

Aidoo, K.E., Tester, R.F., Morrison, J.E. & Macfarlane, D. (1996). The composition and microbial quality of pre-packed dates purchased in Greater Glasgow. *International Journal of Food Science & Technology*, 31, 433-438.

Altekruse, S.F., Timbo, B.B., Mowbray, J.C., Bean, N.H. & Potter, M.E. (1998). Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973–1992: Sanitary manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Protection*, 10, 1405-1407.

Anderson, M.R.P. & Pascual, V.C. (2000). *Microbiologia alimentaria: Metodologia analítica para alimentos y bebidas* (2^a ed.). Ediciones Diaz de Santos.

Angelotti, R., Foster, M.J. & Lewis, K.H. 1961. Time-temperature effects on *Salmonellae* and *Staphylococci* in foods. III. Thermal death time studies. *Applied Microbiology*, 9, 308.

Anunciaçao, L.L.C., Linardi, W.R., do Carmo, L.S. & Bergdoll, M.S. (1995). Production of staphylococcal enterotoxin A in cream-filled cake. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 259-263.

Arbuthnott, J.P. (1990). Staphylococcal toxins in human disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 101–107.

Ares, G., Parentelli, C., Gámbaro, A., Lareo, C. & Lema, P. (2006). Sensory shelf life of shiitake mushrooms stored under passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 191–197.

Bassen, M.K., Gupta, L.K., Jolly, L. & Tewari, R.P. (1989). Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores in custard preparations. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 511.

Baptista, P. & Venâncio, A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos* (1ª ed.). Forvisão - Consultadoria em Formação Integrada. Guimarães, Portugal.

Baptista, P. & Antunes, C. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração*. Vol. II (1ª ed.). Forvisão – Consultadoria em Formação Integrada. Guimarães, Portugal.

Bean, N.H., Joy, S., Goulding, C., Lao, F. & Angulo, J. (1996). Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1988–1992. *Journal of Food Protection*, 10, 1265-1286.

Bergdall, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York, EUA: Marcel Dekker.

Bergholz, T.M., den Bakker, H.C., Fortes, E.D., Boor, K.J. & Wiedmann, M. (2010). Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1537-1549. doi:10.1089/fpd.2010.0624. Acedido em Abril. 27, 2012 em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/fpd.2010.0624>

Boylan, S.L., Acott, K.A. & Labuza, T.P. (1976). *Staphylococcus aureus* challenge study in an intermediate moisture food. *Journal of Food Science*, 41, 918-921.

Britz, T. & Robinson, R.K. (2008). *Advanced Dairy Science and Technology* (1ª ed.). Wiley-Blackwell.

Brown, T., Evans, J.A., James, C., James, S.J. & Swain, M.V. (2006). Thawing of cook-freeze catering packs. *Journal of Food Engineering*, 74, 70-77.

Bryan, F.L. (1976). Public health aspects of cream-filled pastries—A review. *Journal of Milk and Food Technology*, 39, 289-296.

CAC. (1999). *Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life*. Comissão do Codex Alimentarius. CAC/RCP 46.

Campos, M.R.H., Kipnis, A., André, M.C.D.P.B., Vieira, C.A.S., Jayme, L.B., Santos, P.P. & Serafini, A.B. (2006). Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 36, 1221-1227.

Capparelli, E. & Mata, L. (1975). Microflora of maize prepared as tortillas. *Applied and Environmental Microbiology*, 29, 802-806.

Castelvetri, F. (1988). *Proceedings of the Fourth International Conference on Controlled/Modified/Vacuum Packaging*. Long Island, New York, USA.

CDC (1990). Epidemiologic notes and reports update: *Salmonella enteritidis* infections and Grade A shell eggs—United States, 1989. Center for Disease Control and Prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 38, 877.

CDC (2006). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks – United States, 1998-2002. Center for Disease Control and Prevention *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 55, 1-34.

Corradini, M.G. & Peleg, M. (2007). Shelf-life estimation from accelerated storage data. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 37–47.

Costa, R. & Kristbergsson, K. (2009). *Predictive and Risk Assessment*. Acedido em Maio 12, 2012, disponível em http://books.google.pt/books?id=J11jIU0S5PYC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0.

Cowden, J.M., Wall, P.G., Adak, G., Evans, H., LeBaigue, S. & Ross, D. (1995). Outbreaks of foodborne infectious intestinal disease in England and Wales 1992 and 1993. *Communicable Disease Report*, 5, R109-17.

Christiansson, A., Naidu, A.S., Nilsson, I., Wadstrom, T. & Pettersson, H.E. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2595-2600.

Crielly, E.M., Logan, N.A. & Anderton, A. (1994). Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of Applied Microbiology*, 77, 256-263.

Crowley, H., Cagney, C., Sheridan, J.J., Anderson, W., McDowell, D.A., Blair, I.S., Bishop, R.H. & Duffy, G. (2005). *Enterobacteriaceae* in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E. coli* O157:H7 in these products. *Food Microbiology*, 22, 409-414.

Dack, G.M. (1961). Public health significance of flour bacteriology. *Cereal Science Today*, 6, 9.

Daniels, N.A., Mackinnon L. Rowe, S.M., Bean, N.H., Griffin, P.M. & Mead, P.S. (2002). Foodborne disease outbreaks in United States schools. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 21, 623-628.

D'Aoust, J.Y. (1977). *Salmonella* and the chocolate industry: A review. *Journal of Food Protection*, 40, 718.

Decreto-Lei nº 560/99 de 18 de Dezembro. Diário da República nº 293 – Série I – A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Decreto-Lei nº 365/2007 de 2 de Novembro. Diário da República nº 211 – Série I – A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

D'Aoust, J.Y. (1994). *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 11-31.

Directiva 2000/13/CE, de 20 de Março de 2000, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* 109 (6/5/2000) pp. 29 – 42.

Directiva 2006/142/CE 22 de Dezembro de 2006. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L 368. Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas.

Donnelly, C.W. (2001). "*Listeria monocytogenes*", in: *Foodborne Disease Handbook*, ed. Hui, Y.H., Pierson M.D. & Gorham, J.R. pp. 213-246. New York, EUA: Marcel Dekker.

Ebel, E.D., David, M.J. & Mason, J. (1992). Occurrence of *Salmonella enteritidis* in the U.S. commercial egg industry: Report on a national spent hen survey. *Avian Diseases*, 36, 646-654.

Elliot, R.P. (1980). *Cereals and cereal products*, in: *Microbial Ecology of Foods*, pp. 669-730. New York, EUA: Academic Press.

El-Gazzar, F.E. & Marth, E.H. (1992). *Salmonellae*, salmonellosis, and dairy foods: A review. *Journal of Dairy Science*, 75, 2327-2343.

El-Khoury, W. (2000). Control of *Bacillus cereus* in English-style crumpets. Science Thesis, McGill University, Montreal.

Esteves, A., Patarata, L., & Martins, C. (2003). "Microrganismos psicotróficos (*Listeria* spp.; *Yersinia enterocolitica*) em Alheira". *International Conference Food Protection*. Cooperativa de ensino Superior Egas Moniz. Lisboa, Portugal: 80-81.

Esteves, A., Patarata, L., Saraiva, C., Silva, J.A. & Martins, C. (2000). "Microbiological Profile and Hazards of Traditional Sausage from Trás-os-Montes." *47th International Congress of Meat Science and Technology*. Buenos Aires, Argentina. Vol2,6II-P4:704-705.

Esteves, P., Macedo, S., Luz, C., Soares, P. & Vaz de Almeida, M.D. (2002). *Manual de Higiene e Segurança Alimentar*. Inatel. Lisboa, Portugal.

European Food Safety Authority (2009). The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 271.

European Food Safety Authority (2011). The European Union Summary on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *The EFSA Journal* 2011; 9 (3):2090.

Evans, M.R., Tromans, J.P., Dexter, E.L.S., Ribeiro, C.D. & Gardner, D. (1996). Consecutive *Salmonella* outbreaks traced to the same bakery. *Epidemiology and Infection*, 116, 161-167.

Fan, X., Niemira, B.A. & Sokorai, K.J.B. (2003). Use of ionizing radiation to improve sensory and microbial quality of fresh-cut green onion leaves. *Journal of Food Science*, 68, 1478-1483.

Farber J.M. (1993). Current research on *Listeria monocytogenes* in food: an overview. *Journal of Food Protection*, 56, 640-643.

Ferron, P. & Michard, J. (1993). Distribution of *Listeria* spp. in confectioners pastries from western France: Comparison of enrichment methods. *International Journal of Food Microbiology*, 18, 289-303.

Foegeding, P.M. & Berry, E.D. (1997). Cold temperature growth of clinical and food isolates of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 60, 1256-1258.

Food Safety and Inspection Service (1998). The Food Safety Educator New Consumer Research Driving. *Food Safety Education*, 4.

Food Safety Authority of Ireland (2005). Guidance note no. 18 – Determination of food shelf-life. Dublin, Ireland.

Food Safety Authority of Ireland (2006). Guidance note no. 15 – Cook-chill systems in the food service sector (revision I). Dublin, Ireland.

Forsythe, S.J. (2002). *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed Editora.

Frampton, A. (1989). Prevention of rancidity in confectionery and biscuits. *The Manufacturing Confectioner*, 129–136.

Franco, B.G.M.F. & Landgraf, M. (1996). *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo, Brasil: Atheneu.

Fu, B. & Labuza, T.P. (2000). Shelf life testing: procedures and prediction methods for frozen foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 7, 2-46.

Fustier, P., Lafond, A.C.P.C. & Lamarche, F. (1998). Effect of Inoculation Techniques and Relative Humidity on the Growth of Molds on the Surfaces of Yellow Layer Cakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 192-196.

Galic, K., Curic, D. & Gabric, D. (2009). Shelf Life of Packaged Bakery Goods—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 405–426.

Gamazo, C., Lopez-Goñi, I. & Diaz, R. (2005). *Manual practico de Microbiologia*. (3ª ed.). España: Elsevier.

Gámbaro, A., Giménez, A., Varela, P., Garitta, L. & Hough, G. (2005). Sensory shelf-life estimation of alfajor by survival analysis. *Journal of Sensory Studies*, 19, 500–509.

Gámbaro, A., Ares, G. & Giménez, A. (2006). Shelf life estimation of apple baby food. *Journal of Sensory Studies*, 21, 101–111.

Garbutt, J. (1997). *Essentials of Food Microbiology*. Londres, Reino Unido: Arnold.

- Gardial, S.F., Clemons, D.S., Woodruff, R.B., Schumann, D.W. & Burns, M.J. (1994). Comparing consumer's recall of prepurchase and postpurchase product evaluation experiences. *Journal of Business Research*, 20, 548–560.
- Gifford, H., Lorenz, K. & Sofos, G. (1991). Analysis of bakery products for the presence of *Listeria monocytogenes*. *Lebensmit.-wissenschaft Technology*, 2, 476.
- Gilbert, R.J., Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C.D., Richards, J., Roberts, D. & Bolton, F.J. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health*, 3, 163-167.
- Giletto, A. & Fyffe, J.G. (1998). A novel ELISA format for the rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin A. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, 62, 2217-2222.
- Giménez, A., Ares, G. & Gámbaro, A. (2008). Survival analysis to estimate sensory shelf life using acceptability scores. *Journal of Sensory Studies*, 23, 571-582.
- Giménez, A., Varela, P., Salvador, A., Ares, G., Fiszman, S. & Garitta, L. (2007). Shelf life estimation of brown bread: A consumer approach. *Food Quality and Preference*, 18 196–204.
- Golden, D.A., Rhodehamel, E.J. & Kautter, D.A. (1993). Growth of *Salmonella* spp. in cantaloupe, watermelon, and honeydew melons. *Journal of Food Protection*, 56, 194-196.
- Gómez, M., Oliete, B., Pando, V., Ronda, F. & Caballero, P.A. (2008). Effect of fermentation conditions on bread staling kinetics. *European Food Research and Technology*, 226, 1379–1387.
- Gómez, M., Ruiz-París, E., Oliete, B. & Pando, V. (2010). Modeling of texture evolution of cakes during storage. *Journal of Texture Studies*, 28, 17-33.
- Granum, P.E. (1997). *Bacillus cereus*. In *Food Microbiology— Fundamentals and Frontiers*, ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. p. 327, Washington, D.C.: ASM Press.
- Greig, J. D. & Lee, M.B. (2009). Enteric outbreaks in long – term care facilities and recommendations for prevention: a review. *Epidemiology and Infection*, 177, 145-155.

- Hao, Y-Y., Scouten, A.J. & Brackett, R.E. (1999). Cheesecake: A potential vehicle for Salmonellosis? *Journal of Food Protection*, 62, 26-29.
- Harcar, T. & Karakaya, F. (2005). A cross-cultural exploration of attitudes toward product expiration dates. *Psychology and Marketing*, 22, 353–371.
- Harmon, S.M. & Kautter, D.A. (1991). Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *Journal of Food Protection*, 54, 372-374.
- Hartel, R.W. & Heldman, A.W. (1997). *Principles of Food Processing*. New York, USA: Aspen Publishers.
- Health Protection Agency (2009). Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the market.
- Hebeda, R.E. & Zobel, H.F. (1996). *Baked Goods Freshness*. New York, USA: Marcel Dekker.
- Henriques, A.R.B.C.S. (2008). *Avaliação da vida útil de refeições "cook-chill" e "cook-freeze": indicadores microbiológicos, físico-químicos e sensoriais*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Hintlian, C.B. & Hotchkiss, J.H. (1986). The safety of modified atmosphere packaging: a review—do modified atmospheres enhance pathogenesis but delay signs of spoilage? *Food Technology*, 40, 70-76.
- Hird, D.W. & Genigeorgis, C. (1990). "*Listeriose in food animals: clinical signs and livestock as a potential source of direct (non foodborne) infection for humans*." In: *Foodborne Listeriosis*, ed. Miller, A.J., Smith, J.L. & Somkuti, G.A. pp. 31-40. Amsterdam, The Netherlands: Society for Industrial Microbiology, Elsevier.
- Hof, H., Nichterlein, T. & Kretschmar, M. (1994). "When are *Listeria* in food a health risk?" *Trends in Food Science & Technology*, 5, 185-189.
- Hough, G., Guaritta, L. & Gómez, G. (2006). Sensory shelf-life predictions by survival analysis accelerated storage models. *Food Quality and Preference*, 17, 468-473.

Hough, G., Langohr, K., Gómez, G. & Curia, A. (2003). Survival analysis applied to sensory shelf life of foods. *Journal of Food Science*, 68, 359–362.

Hough, G., Sánchez, R.H., Garbarini de Pablo, G., Sánchez, R.G., Calderón Villaplana, S., Giménez, A.M. & Gámbaro, A. (2002). Consumer acceptability versus trained sensory panel scores of powdered milk shelf-life defects. *Journal of Dairy Science*, 85, 1-6.

Hozov'a, B., Kukurov'a, I., Turicov'a, R. & Dodok, L. (2002). Sensory quality of stored croissant-type bakery products. *Czech Journal Food Sciences*, 20, 105–112.

Hui, Y.H., Pierson, M.D. & Gorham, J.R. (2001). *Foodborne Disease Handbook* (2^a ed.). Revised and expanded. Volume 1: Bacterial Pathogens. New York, USA: Marcel Dekker.

Humphrey, T.J., Martin, K.W. & Whitehead, A. (1994). Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT 4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection*, 113, 403-409.

Humphrey, T.J., Whitehead, A., Gawler, A.H.L., Hanely, A. & Rowe, B. (1991). Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiology and Infection*, 106, 489.

INSA. (2005). Valores Guia para a avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

INSA. (2007). A Temperatura e a segurança alimentar. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

ICMSF(1996a). *Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Pathogens*. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. New York, USA: Blackie Academic & Professional.

ICMSF(1996b). "*Listeria monocytogenes*." In: *Microorganismos de los Alimentos: Características de los patógenos microbianos*, ed. Roberts T.A., Baird-Parker, A.C. & Tompkin, R.B. pp. 165-210. International Commission on Microbiological Specifications for Foods Zaragoza, España: Editorial Acribia.

Institute of Food Safety & Technology (2007). Acedido em Abril, 14, 2012, disponível em: http://www.iit.edu/ifsh/research_centers/ncfst/

ISO 6658 (1985). *Sensory analysis. Methodology. General guidance*. International Organization for Standardization. Switzerland.

ISO 11290-1 (1996). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization. Switzerland.

ISO 6888-1 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*. International Organization for Standardization. Switzerland.

Jablonski, L.M. & Bohach, G.A. (1997). *Staphylococcus aureus*. In *Food Microbiology—Fundamentals and Frontiers*, ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. pp. 353-375. Washington, D.C.: ASM Press.

Jackson, V. I., Blair, I.S., McDowell, D.A. Kennedy, J. & Bolton, D.J. (2007). The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control*, 18, 346-351.

Jarvis, B. (1972). Mold spoilage of foods. *Process Biochemistry*, 7, 11.

Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7^a ed.). Estados Unidos da América, EUA: Springer.

Johnson, E.A., Nelson, J.H., & Johnson, M. (1990). Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. III. Technology, discussion, recommendations, bibliography. *Journal of Food Protection*, 53, 610-623.

Jouve, J.L. (1994). Critères microbiologiques et *Listeria monocytogenes*. *Proposition de L'ICMSF*. Document de l'École Nationale Vétérinaire, pp. 1-13. Nantes, France.

Kaur, P. (1986). Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. *Journal of Applied Microbiology*, 60, 513-516.

Kirschner, L.M. & Von Holy, A. (1989). Rope spoilage of bread. *South African Journal Science*, 85, 425.

Kneifel, W. & Berger, E. (1994). Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *Journal of Food Protection*, 57, 893-901.

Kohn, S. (2000). An update of the U.S. baking industry. *Cereal Foods World*, 45, 94.

Koutsoumanis, K., Taoukis, P.S. & Nychas, G.J.E. (2005). Development of a safety monitoring and assurance system for chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 253–260.

Kramer, J.M. & Gilbert, R.J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In *Foodborne Bacterial Pathogens*, ed. Doyle, M.P. pp. 22. New York, USA: Marcel Dekker.

Kulp, K. (1979). Staling of bread. *American Institute of Baking, Technical Bulletin*, 1, 1.

Labuza, T.P. (1982) *Fresh Bakery Products, Shelf-Life Dating of Foods*. Westport, USA: Food and Nutrition Press.

Labuza, T. P. (1985). *An integrated approach to food chemistry: Illustrative cases*. In: *Food chemistry*. ed. Fennema, O.R. pp. 913-917. New York, USA: Marcell Dekker Inc.

Labuza, T. (2000). The search for shelf life – An update on continued efforts in understanding practical strategies for determining and testing the shelf life of food products. *Food Testing Analysis*, 5, 1-21.

Lacasse, D. (1995). *Introduction à la Microbiologie Alimentaire*. Les éditions Saint-Martin. ISBN:972-771-102-2.

Larsen, H.D. & Jorgensen, K. (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 179-186.

Lawrie, R. A. & Ledward, D. A. (2006). *Lawrie's Meat Science*. (7^a eds.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Ledauphin, S., Pommeret, D. & Qannari, E.M. (2006). A Markovian model to study products shelf-lives. *Food Quality and Preference*, 17, 598-603.

Leela, R.K., Sankaran, R. & Vijayaraghavan, P.K. (1981). Occurrence of enterotoxigenic staphylococci in raw, processed, and ready-to-eat foods—I. isolation and biochemical characteristics. *Indian Journal Nutrition Diet*, 18, 197.

- Legan, J.D. & Voysey, P.A. (1991). Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Microbiology*, 70, 361-371.
- Leuschner, R.G.K., O'Callaghan, M.J.A. & Arendt, E.K. (1998). *Bacillus* Spoilage in Part-baked and Rebaked Brown Soda bread. *Journal of Food Science*, 63, 915-918.
- Li, C.T., Wick, M. & Marriott, N.G. (1999). Evaluation of Lipid Oxidation in Animal Fat. Research and Reviews: Meat. *The Ohio State University Special Circular*, 172-199.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulte, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A. & Broome, C.V. (1988). Epidemic Listeriosis Associated with Mexican-Style Cheese. *The New England Journal of Medicine*, 319, 823-828.
- Likar, K. & Jevsnič, M. (2006). Cold chain maintaining in food trade. *Food Control*, 17, 108-113.
- Lorber, B. (1990). "Clinical Listeriosis- implication for pathogenesis." In: *Foodborne Listeriosis*, ed. Miller A.J., Smith, J.L. & Somkuti, G.A. pp. 41-50. Amsterdam, The Netherlands: Society for Industrial Microbiology, Elsevier.
- Lues, J.F.R. & Van Tonder, I. (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, 18, 326-332.
- Lund, B.M. (1990). Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Journal Foodborne Illness*, 336, 982-986.
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Mäkelä, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H. & Siitonen, A. (2000). An Outbreak of *Listeria Monocytogenes* Serotype 3a infections from Butter in Finland. *The Journal Infectious Diseases*, 181, 1838-1841.
- MacDonald, K.L., Eidson, M., Strohmeyer, C., Levy, M.E., Wells, J. G., Puhr, N.D., Wachsmuth, K., Hargrett, N.T. & Cohen, M.L. (1985). A Multistate Outbreak of Gastrointestinal Illness Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Imported Semisoft Cheese. *The Journal of Infectious Diseases*, 4, 716-720.
- Malkki, Y. & Rauha, O. (1978). Mold inhibition by aerosols. *Baker's Digest*, 52, 47.

Man, C.M.D. (2004). Shelf-life testing. In R. Steele (eds.) *Understanding and Measuring the shelf-life of Food*. England: CRC Press.

Marchi, P.G.F. (2006). *Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Jaboticabal, São Paulo: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista.

McKinley, T.W. & Clarke, E.J. (1964). Imitation cream filling as a vehicle of staphylococcal food poisoning. *Journal of Milk Food Technology*, 27, 302.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.

Mekalanos, J.J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 174, 1-7.

Mendes, P.V.F. (2009). *Determinação da vida útil de 2 grupos de alimentos prontos a comer comercializados em estabelecimentos de take away*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa

Moreno, A.J., Orr, C.D., Morales, E. & Weisman, I.M. (1985). *Bacillus cereus*, diarrhea, and home-dried apples. *Annals of Internal Medicine*, 102, 868-869.

Mossel, D.A.A. & García, B.M. (1985). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos* (1ª ed.). Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia, SA.

Murmann, L., Dilkin, P., Kowalski, C.H., Almeida, C.A. & Mallmann, C.A. (2004). Temperaturas de conservadores a frio em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria/RS. *Revista de Higiene e Segurança Alimentar*, 19, 30-34.

Muñoz, A.M., Civille, V.G. & Carr, B.T. (1992). *Sensory Evaluation in Quality Control*, Van Nostrand Reinhold, New York, NY: Elsevier.

Nakashima, S.M.K., André, C.D.S. & Franco, B.D.G.M. (2000). Revisão: Aspectos de Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, 3, 41-51.

New Zealand Food Safety Authority (2005). A guide to calculating shelf-life of foods. Information booklet for the food industry. Acedido em Fev. 19, 2012 em: <http://www.nzfsa.govt.nz>.

NP 3005 (1985). *Norma Portuguesa, Microbiologia alimentar: Preparação das diluições para análise microbiológica*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

NP 3227-1(1987). *Norma Portuguesa, Microbiologia Alimentar: Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25°C*. Instituto Português de qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

NP 2079 (1989). *Norma Portuguesa, Microbiologia Alimentar: Regras gerais para análise microbiológica*. Instituto Português de Qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

NP 4137 (1991). *Norma Portuguesa, Microbiologia alimentar: Regrais gerais para a determinação de Enterobacteriaceae sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias*. Instituto Português de Qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

NP 4405 (2002). *Norma Portuguesa, Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C*. Instituto Português de Qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

Oliveira, A.B.A., Paula, C.M.D., Capalonga, R., Cardoso, M.R.I & Tondo, E.C. (2010). Foodborne diseases, Main etiologic agents and general aspects: A review. *Revista HCPA*, 30, 279-285.

Oliveira, M.M., Brugnera, D.F., Alves, E. & Piccoli, R.H. (2010). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 97-106.

Ooraikul, B. (1991). *Modified atmosphere packaging of food*, p. 49. New York, EUA: Ellis Horwood.

Ovca, A. & Jevsnik, M. (2009). Maintaining a cold chain from purchase to the home and at home: Consumer opinions. *Food Control*, 20, 167-172.

- Pafumi, J. (1986). Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *Journal of Food Protection*, 49, 958-963.
- Pintado, C.M.B.S., Oliveira, A., Pampulha, M.E. & Ferreira, M.A.S.S. (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, 22, 79-85.
- Pirttijarvi, T.S., Ahonen, L.M., Maunuksela, L.M. & Salkinoja-Salonen, M.S. (1998). *Bacillus cereus* in a whey process. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 31.
- Poimenidou, S., Belessi, C.A., Giaouris, E.D., Gounadaki, A.S., Nychas, G.J.E. & Skandamis, P.N. (2009). *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7182-7188.
- Potter, M.E., Ayala, S.G. & Silarug, N. (1997). *Epidemiology of foodborne diseases. In Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*, ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. p. 376. Washington, D.C.: ASM Press.
- Powers, E.M., Latt, T.G. & Brown, T. (1976). Incidence and levels of *Bacillus cereus* in processed spices. *Journal Milk Food Technology*, 39, 668-670.
- Pruthi, J. S. (1999). *Quick Freezing Preservation of Foods: Foods of plant origin*. Paris, França: Allied Publishers Limited.
- Public Health Laboratory Services (1993). Recent outbreaks of salmonellosis. *Communicable Disease Report*, 3, 1.
- Quail, K.J. (1996). *Arabic bread production*. EUA: American Association of Cereal Chemists.
- Quintavalla, S. & Parolari, G. (1993). Effects of temperature, aw and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: A response surface methodology study. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 207-216.
- Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F. & Debevere, J. (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference*, 15, 259-327.

Refrigerated Foods Association (RFA) (2009). Standardized Protocol for Determining the Shelf Life of Refrigerated Ready-To-Eat (RTE) Foods (revised January 2009).

Regulamento (CE) nº 178/2002 de 28 de Janeiro de 2002. *Jornal Oficial da União Europeia* nº L 31. Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas.

Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005. *Jornal oficial da União Europeia* nº L338/1. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.

Richter, K.S., Dorneanu, E., Eskridge, K.M. & Rao, C.S. (1993). Microbiological quality of flours. *Cereal Foods World*, 38, 367-369.

Richter, K.S., Weaver, G.L., Dorneanu, E. & Cagampang, A.E. (1991). Survival of *Listeria monocytogenes* in cake and straight grade flour heat and non-heat processed. *Cereal Foods World*, 36, 729.

Roca, E., Broyart, B., Guillard, V., Guilbert, S. & Gontard, N. (2008). Predicting moisture transfer and shelf-life of multidomain food products. *Journal of Food Engineering*, 86, 74-83.

Rocourt J. & Cossart P. (1997). "*Listeria monocytogenes*.", In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontier*, ed. Doyle M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. pp. 337-352. Washington D.C.: ASM Press.

Rodgers, S. (2004). Novel approaches in controlling safety of "cook-chill" meals. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 366-372.

Rybka-Rodgers, S. (2001). Improvement of food safety design of cook-chill foods. *Food Research International*, 34, 449-455.

Ryser, E.T. & Marth, E.H. (2007). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, (3ª ed.). Estados Unidos de América: CRC Press.

Sadek, M.A., El-Zayet, F.M., El-Fadeelm, M.G. & Taha, R.A. (1985). Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* and some other microorganisms from balady bread. *Zeitschrift fur die Gesamte Hygiene und Ihre Grenzgebiete*, 31, 623.

Sant`ana, A., Silva, S., Farani, I., Amaral, C. (2003). Qualidade microbiologica de águas minerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 190-194.

Schaffner, D. W. & Schaffner, S. (2004). Microbiological Analysis – Indicator Organisms. *Meat Science*, 37.

Schmidt, D. & Ridley, S.C. (1985). Microbiological and sensory characteristics of a home-style confectionary product prepared with cream cheese. *Journal of Food Quality*, 7, 283-288.

Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P. & Genigeorgis, C. (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 171-177.

Seiler, D.A.L. (1978). The microbiology of cake and its ingredients. *Food Trade Review*, 49, 339-344.

Seiler, D.A.L. (1988). Microbiological problems associated with cereal based foods. *Food Science and Technology*, 2, 37.

Silliker, J.H. & McHugh, S.A. (1967). Factors influencing microbiological stability of butter-cream-type filling. *Cereal Science Today*, 12, 63.

Silva, E.A.J. (1997). *Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos* (2ª ed.). São Paulo, Brasil: Varela.

Singh, T.C. & Cadwallader, K.R. (2002). *The Shelf Life of Foods: An Overview*. In *Freshness and Shelf Life of Foods*, pp. 1-20. Washington, D.C.: American Chemical Society.

Sivasankar, B. (2004). *Food Processing and Preservation*. Índia: PHI Learning Pvt. Ltd.

Slaghuis, B.A., Giffel, M.C., te Beumer, R.R. & Andre, G. (1997). Effect of pasteurization on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal*, 7, 201-205.

Smith, J.P. (1992). *Bakery products*, In *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food*, ed. Parry, R.T. p. 134. Blackie Academic and Professional, London.

Smith, J.P. & Simpson, B.K. (1995). *Modified atmosphere packaging of bakery and pasta products*, In *Principles of Modified Atmosphere and Sous Vide Product Packaging*, ed. Farber, J.M. & Dodds, K.L. p. 207. Lancaster, EUA: Technomic Publishing Company.

- Smith, J.P., Daifas, D.P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J. & El-Khoury, A. (2004). Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 19-55.
- Soares, E. (2007). Qualidade e Segurança Alimentar. Doenças de origem alimentar. Infecções e intoxicações. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2, 6-8.
- Sockett, P.N. (1991). Food poisoning outbreaks associated with manufactured foods in England and Wales 1980–1989. *Communicable Disease Surveillance Centre*, 1, 105-109.
- Sperandio, V. (1998). Características da infecção por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). *Arquivo de Ciências da Saúde Unipar*, 2, 283-287.
- Stewart, C.M., Cole, M.B. & Schaffner, D.W. (2003). Managing the risk of staphylococcal food poisoning from cream-filled baked goods to meet a food safety objective. *Journal of Food Protection*, 66, 1310–1325.
- Sugihara, T.F. (1977). Nontraditional fermentations in the production of baked goods. *Baker's Digest*, 51, 76.
- Sumner, S.S., Albrecht, J.A. & Peters, D.L. (1993). Occurrence of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in bakery products. *Journal of Food Protection*, 56, 722-724.
- Swanenburg, M., Urlings, H.A.P., Keuzenkamp, D.A. & Snijders, J.M.A. (2001). *Salmonella* in the Lairage of Pig Slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, 64, 12-16.
- Sych, J., Castaigne, F. & Lacroix, C. (1987). Effects of initial moisture-content and storage relative-humidity on textural changes of layer cakes during storage. *Journal of Food Science*, 52, 1604–1610.
- Tauxe, R.V., Doyle, M.P., Kuchenmuller, T., Schlundt, J. & Stein, C.E. (2010). Envolving public health approaches to the global challenge of foodborne infection. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 16-28.
- te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Leijendekkers, S. & Rombouts, F.M. (1996). Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiology*, 13, 53-58.

- Thompson, J.M., Waites, W.M. & Dodd, C.E.R. (1993). Detection of rope spoilage caused by *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 481-486.
- Todd, E.C.D. (1982). Foodborne and waterborne disease in Canada, 1977. Annual summary. *Journal of Food Protection*, 45, 865-873.
- Todd, E.C.D. (1989). Preliminary estimates of costs of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis. *Journal of Food Protection*, 52, 586.
- Todd, E.C.D. (1996). Worldwide surveillance of foodborne disease: The need to improve. *Journal of Food Protection*, 59, 82-92.
- Todd, E.C.D. & Notermans, S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1484-1490.
- Torres-Vitela, M.R., Escartin, E.F. & Castillo, A. (1995). Risk of salmonellosis associated with consumption of chocolate in Mexico. *Journal of Food Protection*, 58, 478.
- Tranter, H.S. (1990). Foodborne staphylococcal illness. *The Lancet*, 336, 1044-1046.
- Troller, J.A. & Christian, J.H.B. (1978). *Water Activity and Food*. New York, EUA: Academic Press.
- Valero, A., Carrasco, H. & García-Gimeno, R.M. (2012). *Trends in Vital Food and Control Engineering. Principles and Methodologies for the Determination of Shelf-Life in Foods*, pp. 1-40. Spain: Ayman Hafiz Amer Eissa.
- Valero, A. Carrasco, E. Pérez-Rodríguez, F. García-Gimeno, R.M. Blanco, C. & Zurera, G. (2006). Monitoring the sensorial and microbiological quality of pasteurized white asparagus at different storage temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1281-1288.
- Varma, J.K., Samuel, M.C., Marcus, R., Hoekstra, R.M., Medus, C., Segler, S., Anderson, B.J., Jones, T.F., Shiferaw, B., Haubert, N., Megginson, M., McCarthy, P. V., Graves, L., Gilder, T.V. & Angulo, F.J. (2007). *Listeria monocytogenes* infection from foods prepared in a commercial establishment: a case-control study of potential sources of sporadic illness in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 521-528.

Warburton, D.W. & Weiss, K.F. (1986). Microbiological quality of non-dairy creamers, fillings and toppings. *Journal of Food Protection*, 49, 621-622.

Wells, S.J., Fedorka-Cray, P.J., Dargatz, D.A., Ferris, K., & Green, A. (2001). Fecal Shedding of *Salmonella* spp. by Dairy Cows on Farm and at Cull Cow Markets. *Journal of Food Protection*, 64, 3-11.

Wiedmann, M. (2010). *Ecology of L. monocytogenes and Listeria spp. in natural and food associated environments* [abstract] [versão electrónica]. In Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia (Ed.), *Livro de Actas do Congresso: ISOPOL XVII*.

Wordsnark (2008). Listeria cost Maple Leaf foods \$43M. October 29, Acedido Abril. 27, 2012 em: <http://www.nowpublic.com/health/listeria-cost-maple-leaf-foods-43m>

Wright, J.P., Cornell, J., Rhodes, P., Colley, S., Webster, S. & Ridley, A.M. (1996). Four outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 food poisoning linked to a single baker. *Communicable Disease Report*, 6, 112-115.

Wyatt, C.J. & Guy, V.H. (1981a). Growth of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in retail pumpkin pies. *Journal of Food Protection*, 44, 418.

Wyatt, C.J. & Guy, V.H. (1981b). Incidence and growth of *Bacillus cereus* in retail pumpkin pies. *Journal of Food Protection*, 44, 422-424.

Zinzi, M. (2009). Refrigerated Storage. *Journal of Food Protection*, 53, 129.

ANEXO I

1. Ficha de análise sensorial

Característica		Bolo
Aspeto Geral do bolo	Desagradável	
	Aceitável	
	Agradável/Característica	
	Muito agradável	
Cheiro do Bolo	Desagradável	
	Aceitável	
	Agradável / Característico	
	Muito agradável	
Sabor do Bolo	Desagradável	
	Aceitável	
	Agradável / Característico	
	Muito agradável	
Textura do bolo	Fofo	
	Húmido	
	Duro	
	Seco	
Textura Massa de açúcar	Mole	
	Farinhenta	
	Granulosa	
	Dura	
Textura Creme	Não cremoso	
	Pouco cremoso	
	Cremoso	
	Muito Cremoso	
	Extremamente cremoso	

ANEXO II

1. Resultados da primeira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.

1ª Repetição - Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres				
Microrganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	2,0 x 10	***	***
	T1	3,0 x 10 ³	3,0 x 10 ³	***
	T2	3,0 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁵	5,2 x 10 ²
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	4,4 x 10 ²	***	***
	T1	2,9 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴	***
	T2	3,0 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	5,1 x 10 ³
Microrganismos a 30°C	T0	8,0 x 10	***	***
	T1	3,0 x 10 ³	4,5 x 10 ³	***
	T2	3,0 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵	8,3 x 10 ⁴
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo

2. Resultados da segunda repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.

2ª Repetição - Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres				
Microrganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	1,2 x 10 ²	***	***
	T1	3,0 x 10 ⁴	<10	***
	T2	3,0 x 10 ⁵	4,9 x 10 ³	4,1 x 10 ²
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	<10	***	***
	T1	6,9 x 10 ²	<10	***
	T2	4,6 x 10 ⁵	4,0 x 10	2,0 x 10
Microrganismos a 30°C	T0	1,1 x 10	***	***
	T1	6,6 x 10 ⁴	4,5 x 10 ³	***
	T2	2,8 x 10 ⁷	7,9 x 10 ⁴	5,1 x 10 ⁴
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo

3. Resultados da terceira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, Enterobacteriaceae, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos bolos A, B e C com recheio de mascarpone e frutos silvestres, nos diferentes momentos de análise.

3ª Repetição - Recheio de Mascarpone e Frutos Silvestres				
Microrganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	1,1 x 10	***	***
	T1	5,7 x 10 ⁴	4,0 x 10	***
	T2	7,5 x 10 ⁶	2,6 x 10 ³	5,0 x 10
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	1,1 x 10	***	***
	T1	3,3 x 10 ⁴	1,0 x 10	***
	T2	1,4 x 10 ⁴	7,5 x 10 ³	<10
Microrganismos a 30°C	T0	2,7 x 10 ²	***	***
	T1	2,4 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁴	***
	T2	1,5 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁴	2,6 x 10 ³
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo

4. Resultados da primeira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.

1ª Repetição - Recheio de Doce de Ovo				
Microrganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	9,0 x 10	***	***
	T1	3,0 x 10	7,0 x 10	***
	T2	3,0 x 10 ³	3,2 x 10 ³	4,0 x 10 ²
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	<10	***	***
	T1	<10	<10	***
	T2	2,3 x 10 ⁴	3,0 x 10	1,0 x 10
Microrganismos a 30°C	T0	<10	***	***
	T1	1,7 x 10 ³	1,0 x 10 ³	***
	T2	3,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ²	1,8 x 10 ³
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo

5. Resultados da segunda repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S. aureus* nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.

2ª Repetição - Recheio de Doce de Ovo				
Microrganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	1,1 x 10 ²	***	***
	T1	<10	1,1 x 10	***
	T2	1,1 x 10 ³	2,0 x 10	4,0 x 10
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	3,0 x 10 ³	***	***
	T1	<10	1,0 x 10 ²	***
	T2	<10	<10	<10
Microrganismos a 30°C	T0	3,0 x 10 ³	***	***
	T1	1,7 x 10	1,9 x 10 ³	***
	T2	1,6 x 10 ²	1,7 x 10	5,9 x 10 ²
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo

6. Resultados da terceira repetição. Contagem (ufc/g) de leveduras, *Enterobacteriaceae*, microrganismos a 30°C, *L. monocytogenes* e *S.aureus* nos bolos A, B e C com recheio de doce de ovo, nos diferentes momentos de análise.

3ª Repetição - Recheio de Doce de Ovo				
Microrganismos	Tempo	Bolo A	Bolo B	Bolo C
Leveduras	T0	5,0 x 10	***	***
	T1	1,0 x 10	1,1 x 10	***
	T2	4,0 x 10	1,0 x 10 ²	1,0 x 10
<i>Enterobacteriaceae</i>	T0	<10	***	***
	T1	1,0 x 10	3,0 x 10	***
	T2	<10	<10	<10
Microrganismos a 30°C	T0	<10	***	***
	T1	9,8 x 10 ²	8,9 x 10 ²	***
	T2	3,8 x 10 ²	4,6 x 10 ⁴	5,2 x 10 ²
<i>L. monocytogenes</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	T0	<10	<10	<10
	T1	<10	<10	<10
	T2	<10	<10	<10

***Não foi analisado neste tempo